



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Analiza właściwości spektroskopowych w projektowaniu sond/sensorów komórkowych

Author: Barbara Czaplińska

Citation style: Czaplińska Barbara. (2019). Analiza właściwości spektroskopowych w projektowaniu sond/sensorów komórkowych. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

UNIwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii

Instytut Chemii

Zakład Chemii Organicznej

Rozprawa doktorska

Barbara Czaplińska

**Analiza właściwości spektroskopowych
w projektowaniu sond/sensorów
komórkowych**

Promotor pracy:

dr hab. Robert Musioł

Katowice 2019

*Praca finansowana w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki - OPUS
(DEC-2013/09/B/NZ7/00423) – Głębsze spojrzenie na spektrum aktywności styrylochinolin*



*Pragnę podziękować wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy,
a zwłaszcza
mojemu promotorowi **dr hab. Robertowi Musiołowi** za cenne rady i cierpliwość,
prof dr hab. Marii Jaworskiej za nieocenioną pomoc eksperta w zakresie obliczeń
teoretycznych oraz
dr Katarzynie Malarz za owocne dyskusje i pomoc przy badaniach biologicznych.*

*Szczególne podziękowania składam **moim najbliższym** za wsparcie, dobre słowo i wiarę.*

Spis treści

1.	Cel pracy	10
2.	Wstęp.....	11
2.1	Zjawisko fluorescencji oraz inne procesy dezaktywacji stanu wzbudzonego.....	11
2.2	Sondy komórkowe.....	13
2.2.1	Idea sond komórkowych.....	13
2.2.2	Sensory jonów metali	14
2.2.3	Procesy wykorzystywane przy projektowaniu chemosensorów.....	15
2.3	Barwienie organelli komórkowych	20
2.3.1	Mitochondrium.....	21
2.3.2	Lizosomy	23
2.3.3	Retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego.....	24
2.3.4	Jądro komórkowe	26
3.	Badania własne.....	28
3.1	Chinolina w projektowaniu fluoroforów	28
3.2	Inspiracje oraz określenie celów syntetycznych.....	29
3.2.1	Pochodne chinoliny z ugrupowaniem karbazolowym i bitiofenowym	29
3.2.2	Styrylochinoliny jako potencjalne fluorofory.....	37
3.3	Zasady Schiffa oparte na strukturze styrylochinoliny	38
3.3.1	Zasady Schiffa.....	38
3.3.2	Otrzymywanie oraz analiza strukturalna badanych zasad Schiffa	39
3.3.3	Charakterystyka spektralna pochodnych styrylochinolinowych	43
3.3.4	Oszacowanie zmian momentu dipolowego za pomocą równania Lipperta – Matagi	47
3.3.5	Obliczenia teoretyczne	50
3.3.6	Wpływ wody na właściwości spektroskopowe badanych związków.....	57
3.4	Związek 6s jako wielozadaniowy chemosensor.....	62
3.4.1	6s jako pro – barwnik	62

3.4.1.1	Charakterystyka własności spektroskopowych związku 6s	62
3.4.1.2	Charakterystyka własności spektroskopowych związku SC2	67
3.4.1.3	Założenia przyjęte dla związku 6s jako „pro – barwnika”	69
3.4.1.4	Aktywność biologiczna i wybarwianie komórkowe	71
3.4.2	6s jako sensor jonów Zn^{2+}	76
3.4.2.1	Znaczenie jonów cynku.....	76
3.4.2.2	Chinolina w projektowaniu sensorów cynku.....	76
3.4.2.3	Właściwości kompleksujące związku 6s.....	78
3.4.2.4	Teorie wyjaśniające odpowiedź liganda na jony cynku	82
3.4.2.5	Wykrywanie cynku w komórkach nowotworowych	84
4	Podsumowanie.....	85
4.1	Zakres przeprowadzonych analiz obejmował:	85
4.2	Wnioski	86
4.2.1	Związki 6l-6r	86
4.2.2	Związek 6s.....	87
4.3	Perspektywy badawcze.....	88
5.	Część eksperymentalna	89
5.1	Metody badań fizykochemicznych.....	89
5.1.1	Pomiar temperatury topnienia	89
5.1.2	Chromatografia cienkowarstwowa TLC	89
5.1.3	Oczyszczanie związków	89
5.1.4	Spektroskopia NMR	89
5.1.5	ESI -MS.....	89
5.1.6	Eksperymenty HPLC.....	89
5.1.7	Pomiary spektroskopowe UV-VIS	90
5.1.8	Pomiar pH.....	90
5.2	Obliczenia teoretyczne	90
5.3	Synteza	90
5.3.1	Otrzymywanie substratu wyjściowego do syntezy zasad Schiffa	91

5.3.2	Otrzymywanie zasad Schiffa opartych na strukturze styrylochinoliny, metoda ogólna	92
5.4	Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR	100
6.	Literatura	107
7.	Dorobek naukowy	114
7.1	Publikacje	114
7.2	Zgłoszenia patentowe	115
7.3	Patenty	115
7.4	Konferencje krajowe	115
7.5	Konferencje międzynarodowe	116
7.6	Stáže naukowe i szkolenia	116

Wykaz stosowanych skrótów:

ACN - acetonitryl

Ac₂O – bezwodnik octowy

ATP – adenosynotryfosforan

CAM-B3LYP – hybrydowy funkcjonal wymiennie – korelacyjny

CHEF – efekt wzmocnienie fluorescencji w wyniku chelatowania (*ang. chelation-enhanced fluorescence*)

CHEQ – efekt wygaszania fluorescencji w wyniku chelatowania (*ang. chelation-enhanced quenching*)

COSY – spektroskopia korelacyjna (*ang. Correlation Spectroscopy*)

COX-2 - cyklooksygenaza indukowana, enzym

DAPI – barwnik fluorescencyjny służący do wybarwiania jądra komórkowego (*ang. 4',6-diamidyno-2-fenylindol*)

DCM - dichlorometan

DFT – teoria funkcjonałów gęstości (*ang. density functional theory*)

DMSO - dimetylosulfotlenek

ER – retikulum endoplazmatyczne, siateczka śródplazmatyczna

ESI-MS - elektrorozpylanie-spektrometria mas (*ang. ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry*)

ESIPT – wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie protonu w stanie wzbudzonym (*ang. excited-state intramolecular proton transfer*)

HCT 116 – linia komórkowa ludzkiego nowotworu jelita grubego

HOMO – najwyższy obsadzony orbital molekularny (*ang. Highest Occupied Molecular Orbital*)

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (*ang. high-performance liquid chromatography*)

IC – konwersja wewnętrzna (*ang. internal conversion*)

ICT – wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku (*ang. intramolecular charge transfer*)

ISC – przejście interkombinacyjne (międzysystemowe) (*ang. intersystem crossing*)

LSD – lizosomalne choroby spichrzeniowe (*ang. lysosomal storage disease*)

LUMO – najniższy nieobsadzony orbital molekularny (*ang. Lowest Unoccupied Molecular Orbital*)

MTS – test cytotoksyczności

NHDF – prawidłowe komórki ludzkich fibroblastów (*ang. Normal Human Dermal Fibroblasts*)

NAD(P)H – forma zredukowana estru fosforanowego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

NMR - spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*ang. nuclear magnetic resonance*)

NOESY – spektroskopia NMR wykorzystująca jądrowy efekt Overhauser’a (*ang. Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*)

OLED – organiczna dioda elektroluminescencyjna (*ang. organic light-emitting diode*)

PET – fotoindukowane przeniesienie protonu (*ang. photoinduced electron transfer*)

SC2 – 4 – amino – 2 - styrylochinolina

TD-DFT – zależna od czasu teoria funkcjonałów gęstości (*ang. time dependent density functional theory*)

TLC - chromatografia cienkowarstwowa (*ang. thin layer chromatography*)

TSQ - 6-metoksy-8-p-toluenosulfonamido-chinolina

1. Cel pracy

Celem pracy była synteza nowych fluoroforów opartych na strukturze chinoliny oraz analiza ich własności spektroskopowych. Związki projektowane były pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako sensory komórkowe, stąd w skład badań wchodziły także testy biologiczne. Założeniem w pracy było również ustalenie zależności pomiędzy strukturą związku a określonymi własnościami fotofizycznymi.

2. Wstęp

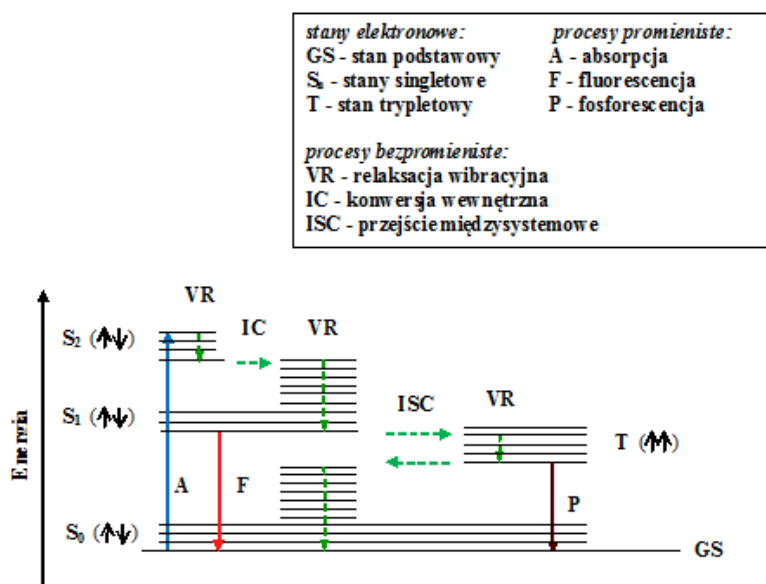
Złożoność procesów zachodzących w układach biologicznych oraz kruchość komórek ludzkich czy zwierzęcych stawia najwyższe wymagania metodom badań wykorzystywanych do ich poznania. Dlatego potrzebne są bezpieczne i efektywne narzędzia, które umożliwią wgląd w świat struktur biologicznych i mechanizmów komórkowych. Na tym polu, w przeciągu ostatnich kilku dekad, metody fluorescencyjne wybiły się na pierwszy plan [1][2]. Pośród nich, mikroskopia fluorescencyjna zasługuje na szczególną uwagę jako potężna technika wizualizacji. Jest prosta, wysoce czuła i stosunkowo bezpieczna dla komórek. Jednak, największą jej zaletą jest możliwość obserwowania pożądaných struktur w czasie rzeczywistym, w żywej komórce. Selektywność obrazowania umożliwiając odpowiednie sondy, które akumulują się w określonym miejscu w komórce bądź łączą się z celem naszego zainteresowania, aktywując proces fluorescencji [3]. Niniejsza praca poświęcona jest otrzymywaniu oraz analizie nowych fluoroforów opartych na strukturze chinoliny, mających potencjalne zastosowanie w obrazowaniu komórkowym.

2.1 Zjawisko fluorescencji oraz inne procesy dezaktywacji stanu wzbudzonego

Fluorescencja jest szczególnym rodzajem luminescencji, gdzie procesem ekscytacji jest absorpcja kwantu światła widzialnego powodująca przejście cząsteczki w stan wzbudzony. Następnie, dezaktywacja stanu wzbudzonego zachodzi poprzez wyemitowanie nadmiaru energii w postaci fotonu światła tzw. fotoluminescencję. Jeśli zanik emisji następuje w czasie ok 10^{-8} s, zjawisko to nazywane jest fluorescencją. Gdy czas zaniku jest dłuższy, mowa jest o fosforescencji. Fluorescencja w większości przypadków jest ścieżką dezaktywacji najniższego wzbudzonego stanu singletowego $S_1 \rightarrow S_0$. Dlatego też, nie jest zależna od długości fali wzbudzenia. Zdarzają się jednak wyjątki, takie jak azulen czy indol, gdzie proces ten zachodzi ze stanu singletowego S_2 [4]. Warto też zaznaczyć, że fluorescencja jest konsekwencją przejścia między tymi samymi stanami elektronowymi (singlet – singlet). Elektron znajdujący się na wzbudzonym orbitalu jest sparowany (przez przeciwny spin) z elektronem orbitalu w stanie podstawowym. Dlatego też, przejście między tymi stanami jest spinowo dozwolone i zachodzi stosunkowo szybko. W przeciwieństwie do fosforescencji, gdzie emisja światła odbywa się z trypletowych stanów wzbudzonych, w których elektron w stanie wzbudzonym posiada tak

samo zorientowany spin co elektron w stanie podstawowym. Przejście to ($T_1 \rightarrow S_0$) jest więc przejściem zabronionym, stąd proces fosforescencji jest o wiele wolniejszy i trwa zazwyczaj milisekundy lub nawet sekundy. W praktyce, te dwa zjawiska często są trudne do rozróżnienia.

Fotoluminescencja nie jest jedyną możliwością uwolnienia nadmiaru energii w stanie wzbudzonym. Mogą także zachodzić procesy bezpromieniste takie jak konwersja wewnętrzna (IC, z ang. *internal conversion*) czy przejście interkombinacyjne (międzysystemowe) $S_1 \rightarrow T_1$ (ISC, z ang. *intersystem crossing*). Jeśli cząsteczka jest wzbudzona do wyższego poziomu wibracyjnego niż najniższy poziom pierwszego stanu wzbudzonego, następuje tak zwana relaksacja wibracyjna. Innymi słowy, cząsteczka oddaje energię np. w wyniku zderzeń z otaczającymi ją cząsteczkami rozpuszczalnika, co prowadzi do osiągnięcia zerowego poziomu wibracyjnego stanu singletowego S_1 . Proces ten, zwany konwersją wewnętrzną, jest przyczyną przesunięcia widma emisji w stronę fal dłuższych (niższej energii), w stosunku do widma absorpcji. Może się zdarzyć, że cząsteczka z najniższego poziomu wibracyjnego stanu S_1 może przejść na poziom wibracyjny stanu trypletowego. Mamy wtedy do czynienia z przejściem międzysystemowym, które ze względu na różną multipletowość stanów wzbudzonych jest przejściem zabronionym. Przejście $S_1 \rightarrow T_1$ poprzedza proces fosforescencji, a prawdopodobieństwo jego wystąpienia zwiększa obecność wzbudzeń $n \rightarrow \pi^*$ [4][5]. Wszystkie wymienione procesy najlepiej ilustruje diagram Jabłońskiego (Rysunek 1)

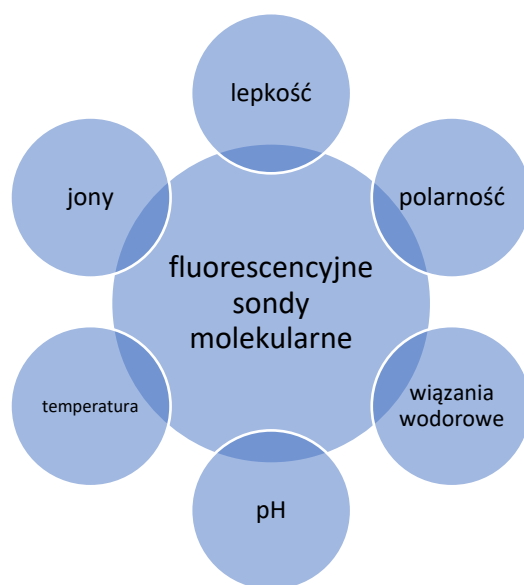


Rysunek 1. Diagram Jabłońskiego prezentujący uproszczony schemat rozmieszczenia poziomów energetycznych cząsteczki oraz procesy zachodzące w wyniku fotowzbudzenia.

2.2 Sondy komórkowe

2.2.1 Idea sond komórkowych

W stosowaniu sond komórkowych wykorzystuje się fakt, że zjawisko fluorescencji jest bardzo wrażliwe na środowisko, w którym zachodzi. Dlatego też, odpowiednio zaprojektowane fluorofory mogą być używane do badania właściwości fizykochemicznych czy biochemicznych układów biologicznych. Zasada działania opiera się na uzyskaniu informacji poprzez obserwację odpowiedzi fluorofora na warunki panujące w danym układzie. Przykładem mogą być związki wrażliwe na zmianę pH, takie jak piranina, która stosowana jest jako indykator pH między innymi we wnętrzu liposomów [6], czy związki reagujące na różnicę w lepkości otoczenia, takie jak pochodna BODIPY (grupa fluoroforów oparta na strukturze kompleksu dipirometanu z atomem boru) stosowana do monitorowania lepkości wewnątrzkomórkowej [7]. Dodatkowo, szczególnie interesującym pomysłem jest zastosowanie sensorów pH do odróżniania komórek zdrowych od komórek nowotworowych [8]. Możemy także wykorzystać inne właściwości związków w zależności od obszaru naszego zainteresowania. Rysunek 2 ilustruje jak szerokie możliwości stwarzają sondy molekularne

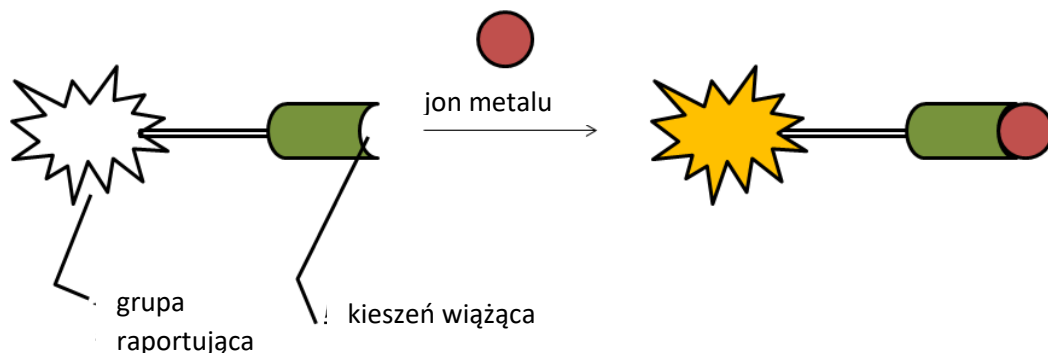


Rysunek 2. Schemat przedstawiający możliwości wykorzystania sond fluorescencyjnych do monitorowania różnych własności układów [4].

Szczególną rolę sondy odgrywają w procesie diagnozowania różnych zaburzeń w organizmie poprzez wykrywanie stężeń jonów, które mogą świadczyć o zmianach metabolizmu. Przykładowo, odpowiedni poziom wapnia ma kluczowe znaczenie w prawidłowym działaniu cyklu komórkowego [9]. Prowadzone są także intensywne badania, w których nadmiar jonów cynku oraz miedzi wiąże się z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych [10]. Rozpoznanie przyczyny choroby, mechanizmu odpowiedzialnego za powstałą dysfunkcję, pozwala ustalić sposób leczenia oraz podjąć nowe próby rozwiązania problemu. W ten sposób, barwniki fluorescencyjne stają się użyteczne w odkrywaniu nowych celów terapeutycznych [11]. Ponadto, na przestrzeni ostatnich lat, fluorescencyjne biosensory zyskały popularność jako czułe narzędzia do badania i odkrywania nowych miejsc wiązania. Informacje otrzymane w procesie wybarwiania białek (wiązania wodorowe, dostępność kieszeni wiążącej, zmiany konformacyjne, polarność) wykorzystywane są więc w projektowaniu nowych leków [12].

2.2.2 Sensory jonów metali

Szczególnie dużą i ważną grupę fluoroforów stanowią sensory jonów metali [13]. Jony metali występujące w naszym organizmie są zaangażowane w wiele złożonych wewnątrzkomórkowych mechanizmów i pełnią niezbędną rolę w utrzymaniu homeostazy. Dlatego, wiedza o czasie i miejscu ich dystrybucji, wpływie ich stężenia na procesy komórkowe, czy zaangażowanie w rozwój chorób ma kluczowe znaczenie. Zastosowanie sensorów jonów metali, w celu monitorowania ich zachowania w strukturach komórkowych jest najlepszym sposobem aby uzyskać część odpowiedzi na te wszystkie pytania. Większość sensorów działa według mechanizmu „off – on”. Oznacza to, że w formie niezwiązanej wykazują one słabą fluorescencję, która znacznie wzrasta po skompleksowaniu odpowiednich jonów. W związku z tym sensor musi posiadać odpowiednią budowę, to jest: zawierać w swojej strukturze jednostkę odpowiedzialną za rozpoznanie danego metalu i związanie go - tzw. kieszeń wiążącą oraz jednostkę fluorofora, czyli tzw. grupę raportującą odpowiedzialną za emisję sygnału (fluorescencję) po związaniu metalu (Rysunek 3) [13][14].



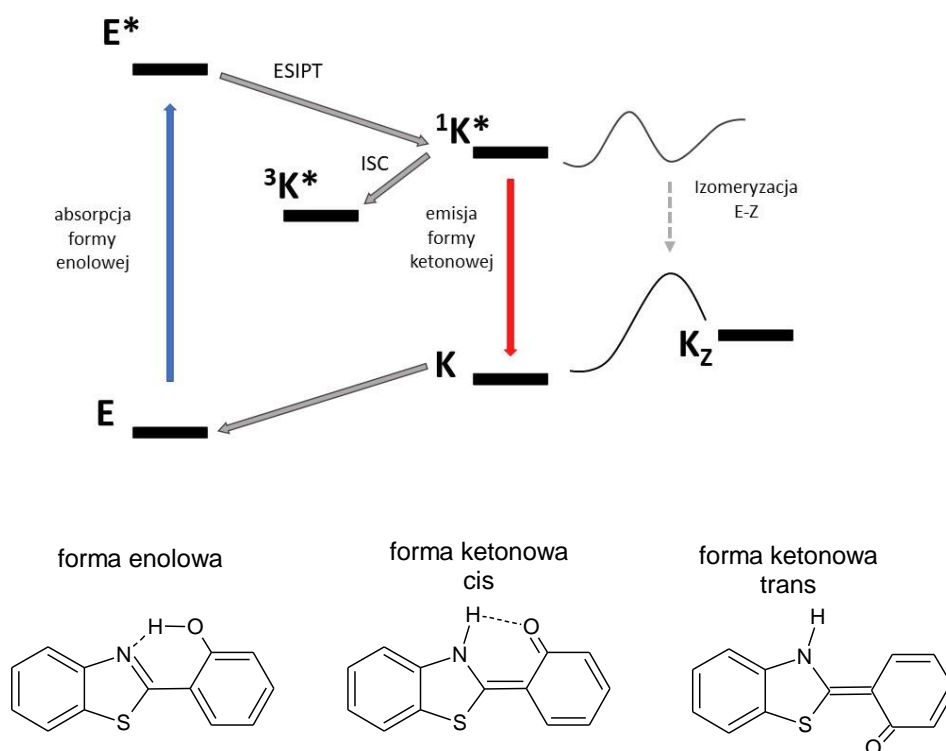
Rysunek 3. Uproszczony model budowy i mechanizmu działania chemosensora.

Istnieje wiele mechanizmów wykorzystywanych w celu zaprogramowania tego wzmocnienia fluorescencji, między innymi: przeniesienie protonu w stanie wzbudzonym (ESIPT) czy fotoindukowane przeniesienie elektronu (PET).

2.2.3 Procesy wykorzystywane przy projektowaniu chemosensorów

Przeniesienie protonu w stanie wzbudzonym ESIPT (z ang. *excited state intramolecular proton transfer*) jest jednym z ważniejszych i bardziej interesujących procesów jakie do tej pory badano. Od jego odkrycia przez Weller'a w 1955 roku, opublikowano wiele doniesień na ten temat [15][16]. Najbardziej charakterystyczną cechą dla ESIPT jest duże przesunięcie Stokesa, które jest kluczowe dla technik fluorescencyjnych. Dlatego też, ze względu na szeroki zakres potencjalnych zastosowań proces ten stał się obiektem zainteresowań w ostatnich latach [17][18][19]. Przyczyną występowania tego zjawiska jest obecność wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego w strukturze fluorofora. Stąd, proces ten jest charakterystyczny między innymi dla zasad Schiffa posiadających grupę hydroksylową – OH w niedalekim sąsiedztwie atomu azotu w wiązaniu C=N. W stanie wzbudzonym zachodzi w takiej sytuacji fotoindukowana tautomerizacja keto-enolowa. Proces przeniesienia protonu jest o wiele szybszy niż proces fluorescencji, co w większości przypadków skutkuje emisją pochodzącą od formy keto ($E \rightarrow E^* \rightarrow K^* \rightarrow K$). Dodatkowym możliwym procesem zachodzącym w stanie wzbudzonym jest izomeria cis – trans. Tak znaczne zmiany strukturalne są właśnie przyczyną dużego przesunięcia Stokesa. Jednakże, ESIPT jest zazwyczaj odpowiedzialny za wygaszenie fluorescencji, stąd emisja wolnych fluoroforów jest z reguły bardzo słaba. Po związaniu jonu

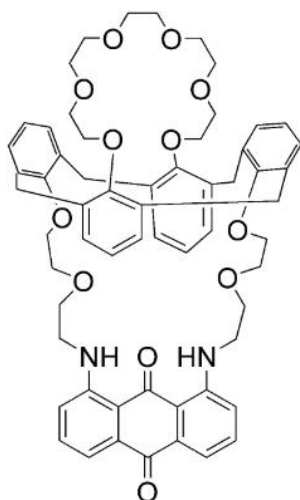
metal, zerwanie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego zapobiega procesowi przeniesienia protonu, tym samym intensywność fluorescencji wzrasta [20][21]. Rysunek 4 przedstawia ogólny mechanizm procesu.



Rysunek 4. Schemat przedstawiający ogólny mechanizm procesu ESIPT [21].

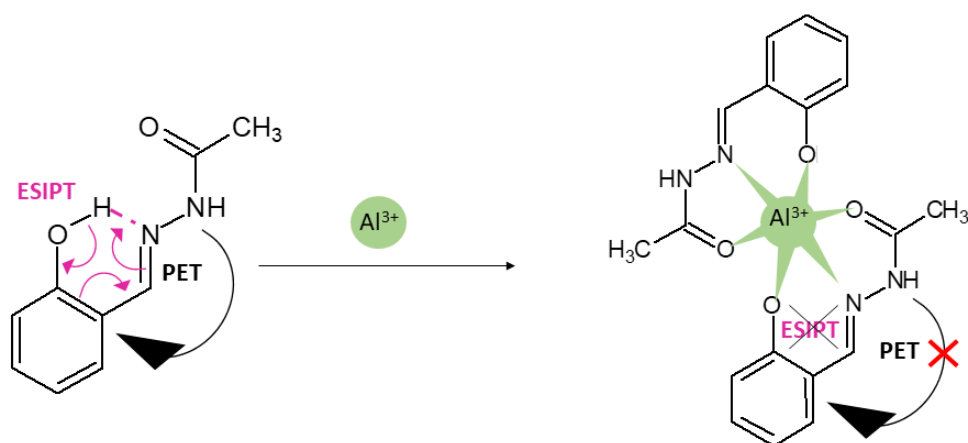
Dodatkowo, emisja fluoroforów przejawiających proces ESIPT jest wrażliwa na środowisko. W rozpuszczalnikach protycznych, fluorescencja formy keto jest zazwyczaj zablokowana i obserwuje się fluorescencję od formy enolowej przy znacznie niższych długościach fali. Dzięki modyfikacjom w strukturze związków ESIPT, można manipulować ich właściwościami spektroskopowymi uzyskując np. podwójną emisję (jednocześnie od formy ketonowej i enolowej), emisję wyłącznie formy enolowej lub wyłącznie formy ketonowej. Jednym z przykładów wykorzystania tego procesu w projektowaniu chemosensorów jest związek służący do wykrywania jonów indy In^{3+} (Rysunek 5), opublikowany w 2010 przez koreańskich naukowców [22]. W rozpuszczalnikach aprotycznych wykazuje on fluorescencję przy 625 nm,

natomiast w alkoholach np. metanolu, pasmo emisji ulega znacznemu przesunięciu hipsochromowemu do długości 525 nm. Zależności te łatwo powiązać z procesem ESIPT – przesunięcie w stronę fal krótszych następuje w wyniku zablokowania procesu przeniesienia protonu. Natomiast, po dodaniu jonów indu, zamiast pasma przy 625 nm, pojawia się pasmo przy 535 nm. Powodem tego jest ta sama sytuacja - wprowadzenie jonów skutkuje zablokowaniem miejsca koordynacyjnego na atomie azotu, co uniemożliwia przeskok protonu.



Rysunek 5. Struktura chemosensora zaprojektowanego w celu wykrywania jonów indu In^{3+} poprzez zaangażowanie procesu ESIPT do mechanizmu detekcji.

Innym przykładem może być wysoce selektywny sensor jonów glinu Al^{3+} zawierający w swej strukturze wiązanie iminowe [23]. Ligand w postaci niezwiązanej wykazuje niebiesko - zieloną fluorescencję przy 485 nm z charakterystycznym dużym przesunięciem Stokesa (168 nm). Po związaniu jonów glinu następuje przesunięcie pasma emisji o ok. 40 nm oraz pojawienie się intensywnej niebieskiej fluorescencji. Zależności te zostały powiązane z procesem przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym. Rysunek 6 przedstawia strukturę związku oraz mechanizm ESIPT.



Rysunek 6. Rysunek przedstawiający strukturę chemosensora stosowanego do wykrywania jonów glinu Al^{3+} oraz ukazujący udział ESIPT w procesie fluorescencji [23].

Dzięki temu, że proces ESIPT jest tak zależny od środowiska – a szczególnie od obecności wiązań wodorowych, znalazł także zastosowanie w czysto biologicznych badaniach. Związki z procesem ESIPT angażuje się przede wszystkim do śledzenia oddziaływań między białkami [21]. Istnieją jednak doniesienia o ich wykorzystaniu do wykrywania procesu apoptozy [24] czy do pomiaru potencjału błonowego [25]. W ostatnim czasie opublikowany został artykuł przeglądowy opisujący w wyczerpujący sposób bardzo szerokie zastosowanie sensorów, których działanie opiera się na wykorzystaniu procesu wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym [26].

Innym ważnym mechanizmem związanym ze wzbudzeniem i emisją jest fotoindukowane przeniesienie elektronu PET (z ang. *photoinduced electron transfer*). Podczas gdy proces przeniesienia protonu skutkuje często zmianą długości fali emisji, samodzielny proces PET powoduje tylko wzrost intensywności fluorescencji [27]. Zazwyczaj towarzyszy on związkowi zawierającym w swojej strukturze atom z niewiążącą parą elektronową (np. atom azotu) połączony z jednostką fluoroforową łącznikiem nie dłuższym niż trzy atomy węgla. W takim przypadku, fluorescencja może być wygaszona na skutek przeniesienia wolnego elektronu na wzbudzony, blisko umiejscowiony fluorofor. Wprowadzenie czynników blokujących PET, takich jak jony metali, aktywuje zjawisko fluorescencji [14].

Kolejnym, bardzo ważnym zjawiskiem jest proces wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia ładunku ICT (z ang. *intramolecular charge transfer*). Występuje on w przypadku gdy

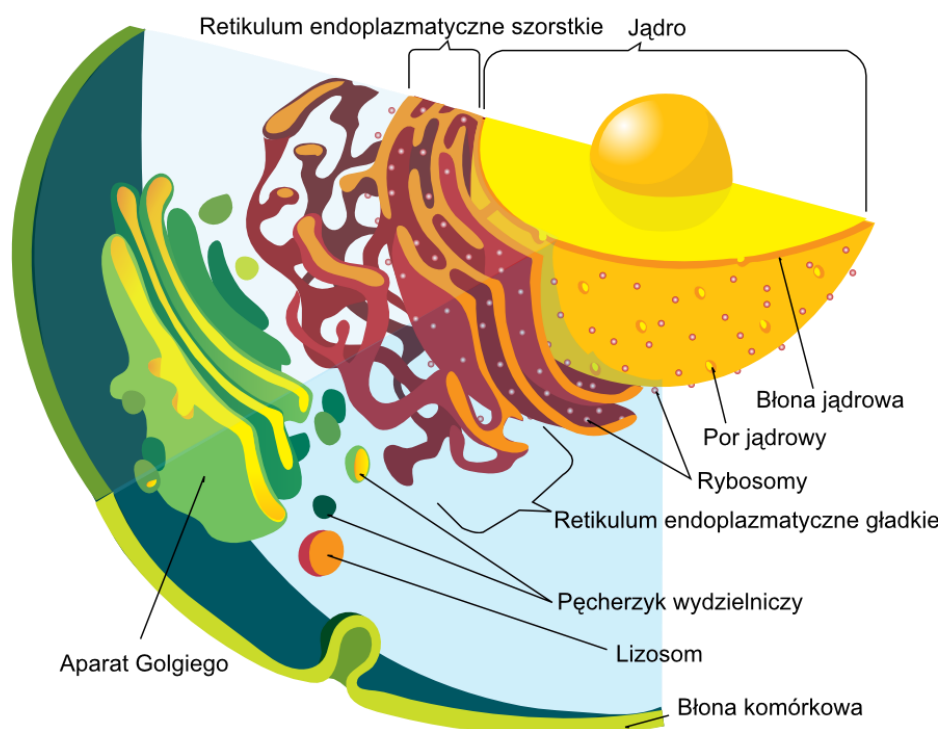
cząsteczka zawiera grupę elektrodonorową (np. $-\text{NH}_2$, $-\text{NMe}_2$, $-\text{CH}_3\text{O}$) sprzężoną za pomocą układu wiązań π z grupą elektronoakceptorową (np. $>\text{C}=\text{O}$, $-\text{CN}$). Związki takie, nazywane związkami push-pull, posiadają inne właściwości w stanie podstawowym i w stanie wzbudzonym. Wynika to ze zmiany rozkładu ładunku po fotoekscytacji prowadzącej do zmiany momentu dipolowego oraz relaksacji struktury. To z kolei, może skutkować pojawieniem się dwóch pasm na widmie emisji - jednego pochodzącego od stanu lokalnego LE (tzw. stan Franka – Condon, z ang. *locally excited state*) oraz drugiego pochodzącego od stanu „charge transfer”. Częściej obserwuje się jednak pojedyncze pasma. Proces przeniesienia ładunku występuje zazwyczaj w polarnych rozpuszczalnikach, a towarzyszące mu duże przesunięcie Stokesa wynika z relaksacji rozpuszczalnika w stanie wzbudzonym [5]. Związki tego typu wzbudzają dużo zainteresowania ze względu na możliwość ich zastosowania w urządzeniach fotoelektronicznych jako materiały o nieliniowych właściwościach optycznych, emiterzy czy w organicznych diodach elektroluminescencyjnych OLED (z ang. *organic light-emitting diodes*) [28][29][30]. Dodatkowo, fluorescencja ze stanu o charakterze “charge-transfer” jest silnie zależna od polarności czy od lepkości rozpuszczalnika. co wykorzystuje się w projektowaniu sensorów chemicznych.

Skompleksowanie jonu metalu może spowodować wzrost lub spadek intensywności fluorescencji. Mówi się więc zarówno o wzmocnieniu fluorescencji w wyniku chelatowania CHEF (z ang. *chelation - enhanced fluorescence*), jak i o wygaszeniu fluorescencji w wyniku chelatowania CHEQ (z ang. *chelation - enhanced quenching*) [31]. Wymienione wyżej procesy są mechanizmami leżącymi u podstawy CHEF lub CHEQ. CHEF jest szczególnie charakterystyczny dla związków N – heterocyklicznych, gdzie najniższym energetycznie przejściem jest przejście $n\pi^*$. Przejście to posiada charakter charge – transfer, na co wskazuje wzrost momentu dipolowego w stanie wzbudzonym. Dodatkowo charakteryzuje je zazwyczaj bardzo niska intensywność fluorescencji. Po związaniu jonu, następuje zamiana przejść $n\pi^*$ i $\pi\pi^*$, co skutkuje wzrostem intensywności emisji światła [32].

Warto zauważyć, że większość chemosensorów zaprojektowanych w ostatnich latach angażuje więcej niż jeden mechanizm.

2.3 Barwienie organelli komórkowych

Jedną z najbardziej popularnych technik fluorescencyjnych, stosowanych w badaniach biologicznych, jest wybarwianie organelli komórkowych [33]. Każde z nich pełni określoną rolę w komórce, a zaburzenia w ich działaniu są początkiem wielu poważnych chorób. Barwniki fluorescencyjne zaprojektowane dla konkretnych struktur biologicznych, cieszą się więc dużą popularnością ze względu na ich wysoką selektywność, specyficzność, szybki czas odpowiedzi oraz łatwość ich stosowania. Obecnie na rynku, można znaleźć szeroki zakres sensorów fluorescencyjnych, lecz problemy z cytotoksycznością, fotostabilnością czy wysokoenergetycznym profilem wzbudzenia i emisji znacznie ograniczają ich zastosowanie. Dlatego też, w ostatnich latach odnotowano duży wzrost zainteresowania omawianym tematem, ze względu na istniejące zapotrzebowanie. Zamieszczony poniżej rysunek (Rysunek 7) przedstawia budowę komórki eukariotycznej ukazując umiejscowienie organelli w cytozolu. Każde z nich zostanie także pokrótce opisane, a w szczególności mitochondrium i lizosomy, które są najczęstszymi obiektami zainteresowania.



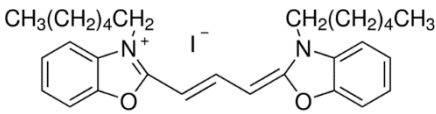
Rysunek 7. Budowa komórki eukariotycznej.

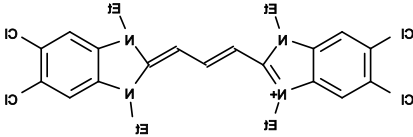
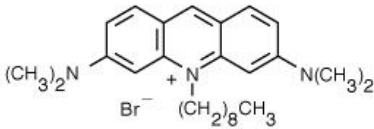
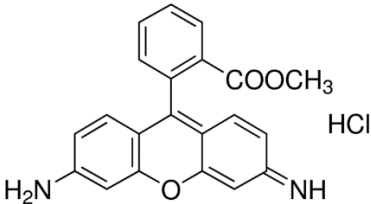
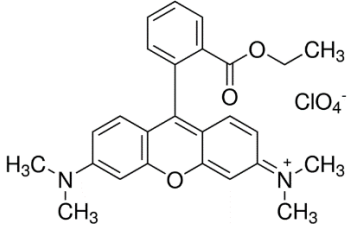
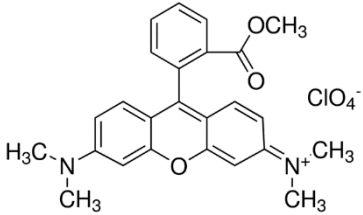
2.3.1 Mitochondrium

Mitochondrium stanowi centrum energetyczne całej komórki. Otoczone jest podwójną błoną, która oddziela je od reszty środowiska. W błonie wewnętrznej zachodzą procesy oddychania tlenowego, w wyniku którego powstaje adenozyntrifosforan (ATP), w którym magazynowana jest energia. Mitochondrium odpowiedzialne też jest za regulację stanu redoks komórki i potencjału błonowego. Ponadto, odgrywa kluczową rolę w apoptozie i jest magazynem jonów wapnia Ca^{2+} . Zaburzenia w funkcjonowaniu tych organelli lub naruszenie homeostazy ich środowiska wpływa na działanie układu nerwowego, mięśni czy narządów takich jak nerki i wątroba [34].

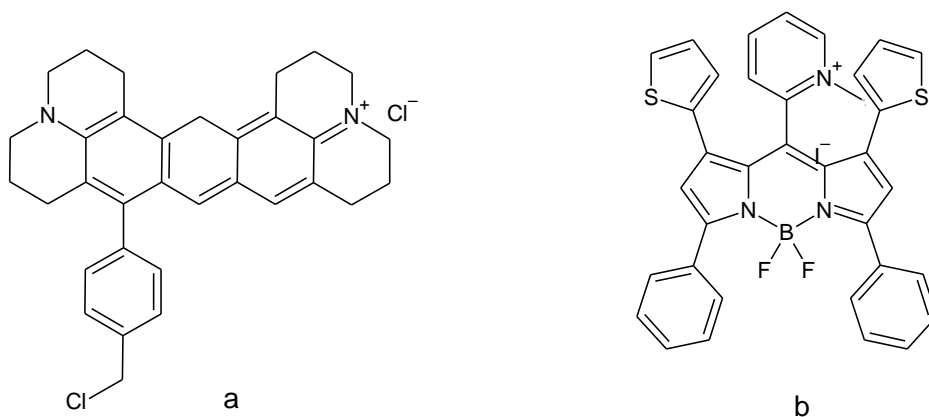
Szczególną uwagę zwraca się na zmiany w potencjale błony mitochondrialnej, którego prawidłowy poziom jest kluczowy dla produkcji ATP oraz poprawnego działania mitochondriów [35]. Z tego powodu, błona stanowi główny cel barwników fluorescencyjnych projektowanych z myślą o monitorowaniu tych organelli. Ze względu na negatywny potencjał błony, barwniki posiadają zazwyczaj pozytywny ładunek, w celu lepszego „nakierowania” ich do celu. Związki te muszą także odznaczać się odpowiednią lipofilowością, co umożliwi im akumulację w błonach mitochondrium. Poniższa tabela (Tabela 1) prezentuje najbardziej znane fluorofory do obrazowania mitochondrium wraz z informacjami na temat ich zastosowań oraz ograniczeń. Do najczęściej występujących problemów należy brak odpowiedniej selektywności lub negatywne skutki uboczne mające wpływ na prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów. Ponadto, w większości przypadków znane barwniki posiadają bardzo małe przesunięcia Stokesa (~20 nm).

Tabela 1. Lista powszechnie znanych barwników fluorescencyjnych przeznaczonych do wybarwiania mitochondrium [36].

Barwnik	Uwagi	ekscytacja [nm]	emisja [nm]
 <p style="text-align: center;">DiOC₆</p>	potencjometryczny sensor do określania potencjału błony mitochondrialnej, w wyższych stężeniach wybarwia także retikulum endoplazmatyczne,	488	501

	może zahamować proces oddychania komórkowego		
 <p>JC-1</p>	ratiomeryczny wskaźnik do określania potencjału błony, w zależności od stężenia wykazuje fluorescencję przy różnych długościach fali	514	527 i 590
 <p>NOA</p>	jego powinowactwo do mitochondriów nie jest powiązane z potencjałem błony, używany do długotrwałych badań	495	522
 <p>Rhod 123</p>	w przeszłości używany do monitorowania potencjału błony, może hamować oddychanie komórkowe	507	529
 <p>TMRE</p>	mogą być używane do określania potencjału błony, hamują jednak oddychanie komórkowe	549	574
 <p>TMRM</p>			

Najbardziej popularną rodziną barwników mitochondrialnych, dostępną komercyjnie jest grupa MitoTracker. Jednak i one nie są pozbawione wad, skłaniających do projektowania nowych generacji. Przykładowo, w 2013 roku grupa chińskich naukowców zaprezentowała rozpuszczalny w wodzie związek oparty na strukturze BODIPY – M-DPT, który wykazuje nie tylko większą fotostabilność, ale także o wiele niższą cytotoksyczność niż MitoTracker Red [37]. Struktury obu związków przedstawione są na Rysunku 8.



Rysunek 8. Struktury barwników fluorescencyjnych wykorzystywanych do barwienia mitochondrium; (a) MitoTracker Red, (b) M-DPT.

2.3.2 Lizosomy

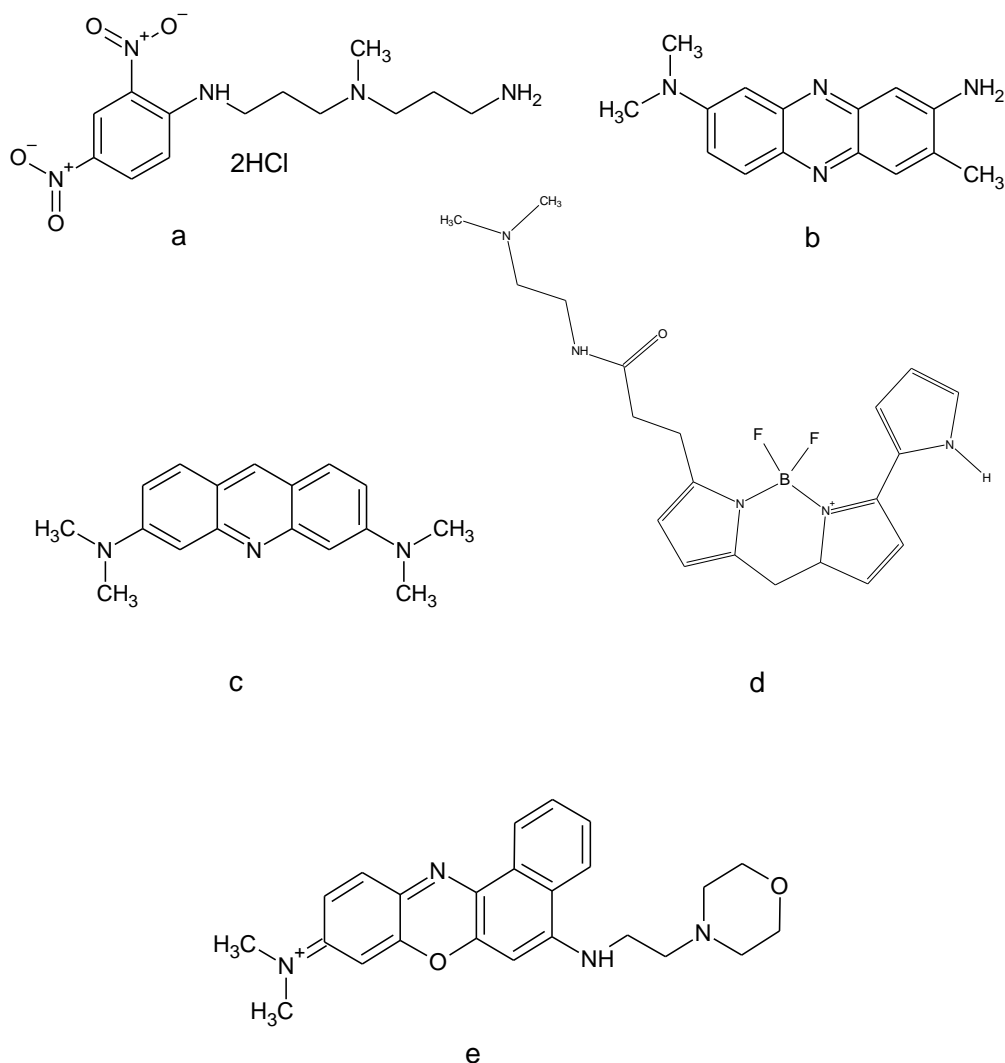
Kolejnymi bardzo ważnymi organellami są lizosomy, mające postać małych, owalnych lub kulistych pęcherzyków. Podczas gdy mitochondrium stanowi centrum energetyczne komórki, lizosomy można nazwać systemem trawiennym, gdzie zachodzi degradacja makroelementów. Jakiegokolwiek zaburzenia w pracy tych organelli mogą prowadzić do rozwoju wielu poważnych chorób, takich jak: nowotwory, choroby neurodegeneracyjne czy metaboliczne. O istotności lizosomów świadczy także Nagroda Nobla przyznana w 1974 roku belgijskiemu naukowcowi Christian'owi de Dovu za odkrycie tych małych elementów komórki [38][39][40]. Od tego czasu, scharakteryzowano grupę lizosomalnych chorób spichrzeniowych (LSD, z *ang.* *lysosomal storage disorders*), która opisywana jest jako grupa mniej więcej 50 chorób metabolicznych spowodowanych defektem genetycznym białek funkcjonalnych [41]. Szacuje

się, że zaburzenia lizosomalne występują z częstością 1:5000 urodzeń. Jednakże, ilość ta może być większa, ze względu na częsty brak prawidłowego powiązania lizosomów ze źródłem zaburzeń [42]. Możliwość monitorowania lizosomów, obserwacji ich zmian może przyczynić się do efektywniejszej diagnostyki. Pomimo tego, że na rynku obecne są barwniki dedykowane lizosomom, wciąż istnieje zapotrzebowanie na tego typu fluorofory, które wynika z ograniczeń tych stosowanych obecnie. Przykładowo DAMP, który jest w stanie akumulować się selektywnie w lizosomach, sam w sobie nie wykazuje fluorescencji. Dlatego też musi być połączony z odpowiednią jednostką raportującą. Co więcej, czerwień obojętna i oranż akrydyny wykazują powinowactwo do kwaśnych struktur, lecz nie są specyficzne dla lizosomów. Najbardziej popularnym barwnikiem jest obecnie LysoTracker (wykorzystywany także w tej pracy), który zarówno jest fluoroforem jak i selektywnie gromadzi się w lizosomach. Jednakże, wzrost pH spowodowany agregowaniem się barwnika przez dłuższy okres czasu, może powodować wygaszanie fluorescencji [43]. Do grupy nowszych barwników należy NBM, który powstał z połączenia powszechnie znanego barwnika Błękitu nilu oraz jednostki zapewniającej selektywność w stosunku do lizosomów – 2–morfolinoetyloaminy. Posiada on odpowiednią energię wzbudzenia (638 nm), a emisja z maksimum przy 678 nm daje wyraźny sygnał w czasie wybarwiania. Związek ten jako pierwszy został użyty do obrazowania zaniku i reprodukcji lizosomów w czasie podziału komórkowego [44]. Struktury opisanych związków przedstawione są na Rysunku 9.

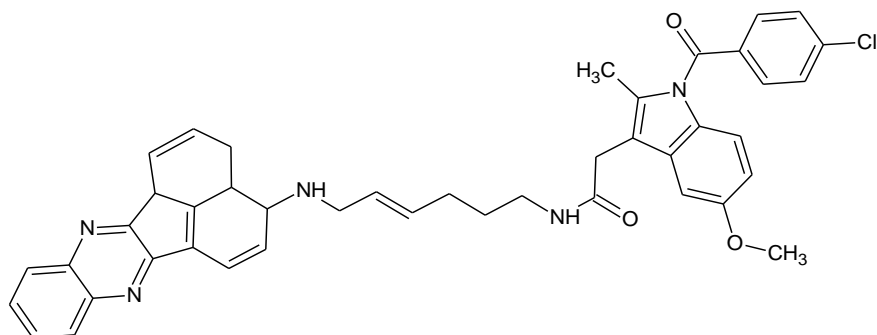
2.3.3 Retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego

Zarówno retikulum endoplazmatyczne ER (inaczej siateczka endoplazmatyczna) jak i aparat Golgiego uczestniczą w syntezie białek i lipidów oraz w transporcie komórkowym. Ponadto, niedawno opublikowane badania sugerują, że sieć, którą razem tworzą może być przyszłym celem leków przeciwnowotworowych. Wynika to z odkrycia, że ER oraz aparat Golgiego mogą aktywować nie tylko procesy naprawcze, ale także programowaną śmierć komórki (apoptozę) w przypadku gdy został przekroczony próg stresu komórkowego. W takiej sytuacji, w aparacie Golgiego następuje kumulacja cyklooksygenazy – 2 (COX – 2), która uznawana jest za biomarker w prawie każdej linii komórek nowotworowych [45]. Co więcej, w 2012 roku opublikowano artykuł zawierający rozważania na temat zaangażowania białek aparatu Golgiego w proces powstawania raka prostaty [46]. Niedużo później, opublikowano doniesienie o nowym barwniku ukierunkowanym na aparat Golgiego ANQ-IMC-6 (Rysunek

10), którego fluorescencja zostaje aktywowana w obecności enzymu COX-2, co czyni go sensorem zdolnym do odróżniania komórek zdrowych od komórek nowotworowych [47].



Rysunek 9. Struktury barwników fluorescencyjnych stosowanych do obrazowania lizosomów; (a) DAMP, (b) czerwień obojętna, (c) oranż akrydyny, (d) LysoTracker, (e) NBM

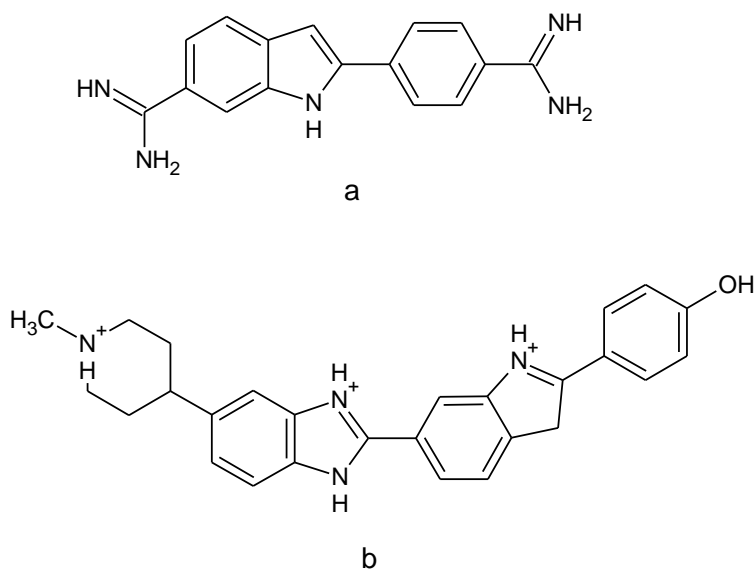


Rysunek 10. Struktura barwnika ANQ-IMC-6, specyficznego dla enzymu COX-2 w aparacie Golgiego.

2.3.4 Jądro komórkowe

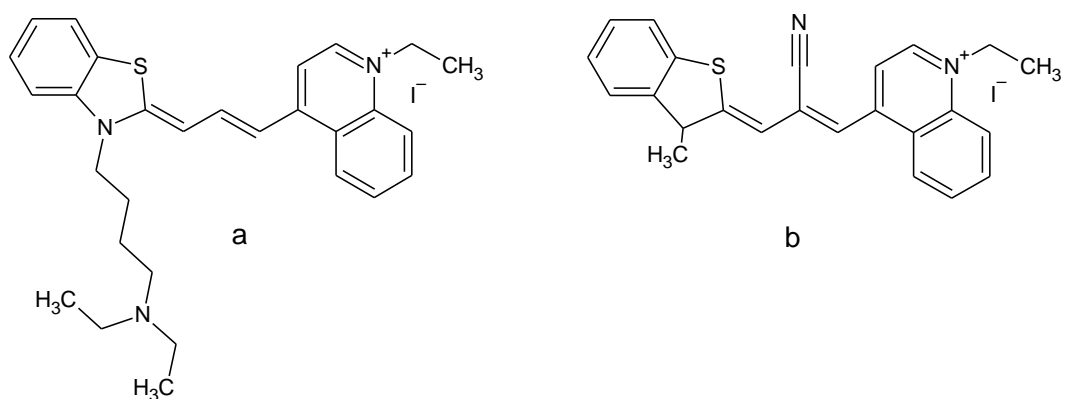
Jądro komórkowe jest największym samodzielnym organellum oraz stanowi centrum kontroli komórki, ze względu na regulowanie procesu ekspresji genów. Innymi słowy, prawidłowe funkcjonowanie jądra komórkowego oraz jego komponentów jest kluczowe dla całego organizmu. Barwniki fluorescencyjne wprowadzane do jądra najczęściej interkalują z cząsteczką DNA (lub RNA). Obrazowanie DNA, jako głównego nośnika informacji genetycznej budzi szczególne zainteresowanie. Wciąż próbuje się uzyskać więcej informacji na temat realnej struktury DNA w chromosomach, mechanizmu ruchów DNA oraz jego reorganizacji w czasie podziałów komórkowych [48]. Dodatkowo bada się zależności innych składników jądra komórkowego, mających wpływ na jego pracę. Przykładowo, w 2013 roku Irina Solovej oraz współpracownicy zidentyfikowali w jądrze dwa receptory odpowiedzialne za utrzymanie chromatyny w odpowiednim miejscu. W obliczu braku tychże białek, następuje relokacja materiału genetycznego oraz zaburzenia w ekspresji genów, co z kolei może prowadzić do poważnych chorób serca, naczyń krwionośnych oraz układu mięśniowego [49].

Najbardziej znanymi barwnikami stosowanymi do obrazowania jądra komórkowego są DAPI i Hoechst 33258 (Rysunek 11), które łączą się z cząsteczką DNA. Wymagają one jednak wysokoenergetycznego źródła wzbudzenia, które może być szkodliwe dla komórek.



Rysunek 11. Najpopularniejsze barwniki fluorescencyjne stosowane do wybarwiania jądra komórkowego – DAPI (a) i Hoechst 33258 (b).

Wśród nowszych barwników można znaleźć DEAB-TO-3 (Rysunek 12a) o zdecydowanie niższej energii wzbudzenia (626 nm) oraz emisji (649 nm). Po związaniu z DNA intensywność jego fluorescencji wzrasta blisko stukrotnie. Jednak, wybarwia jednocześnie cytoplazmę w niewielkim stopniu oraz przejawia niską fotostabilność. Lepszą opcją wydaje się więc być opublikowany kilka lat później barwnik TO3 – CN (Rysunek 12b) o bardzo podobnej strukturze do DEAB-TO-3, lecz ze zmianami, które pozytywnie wpłynęły na długość trwania fluorescencji w komórkach.

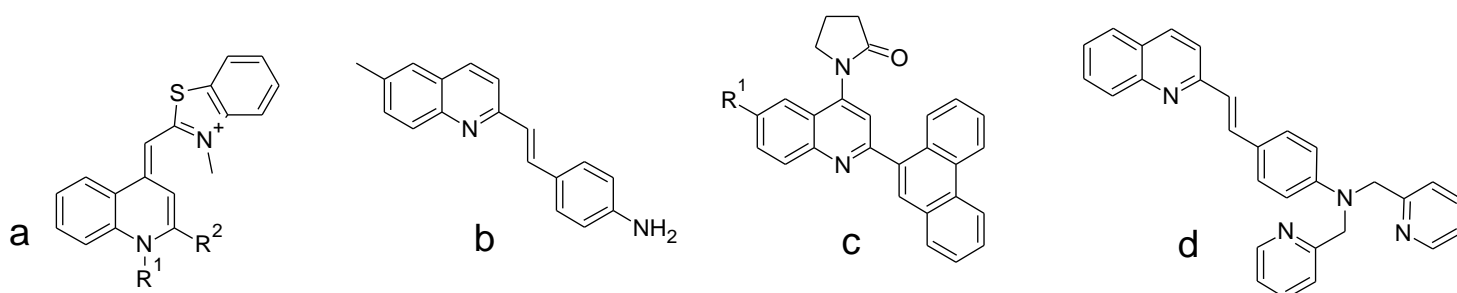


Rysunek 12. Barwniki fluorescencyjne dedykowane cząsteczkom DNA/RNA; (a) DEAB-TO-3, (b) TO3-CN.

3. Badania własne

3.1 Chinolina w projektowaniu fluoroforów

Chinolina jest atrakcyjną strukturą w projektowaniu nowych fluoroforów ze względu na małą masę cząsteczkową, obecność atomu azotu, który stwarza dobre właściwości koordynacyjne oraz możliwość tworzenia wiązań wodorowych. Jednocześnie, chinolina jest znana jako samodzielny układ chromoforowy. Powszechnie wykorzystuje się ją także jako podstawowy fragment szerokiej gamy leków i biologicznie aktywnych substancji [50][51][52]. Z tego powodu uważana jest za strukturę uprzywilejowaną. Obok licznych doniesień na temat aktywności biologicznej chinoliny, można odnaleźć również takie, które dotyczą jej zastosowania w barwieniu fluorescencyjnym. Dzięki płaskiej i sztywnej aromatycznej strukturze pochodne chinoliny mogą oddziaływać z białkami i kwasami nukleinowymi. Za przykład mogą posłużyć struktury przedstawione na Rysunku 13a, które stosowane są do barwienia DNA i RNA [53]. Podobne właściwości zostały wykorzystane przez grupę badawczą Staderini i wsp. Opublikowała ona pochodną styrylochinoliny o potencjalnych terapeutycznych i diagnostycznych właściwościach w chorobie Alzheimer’a, wykorzystując zdolność otrzymanego związku do barwienia płytek A β amyloidowych (Rysunek 13b) [54]. Silnie fluorescencyjne chinoliny były także stosowane do detekcji bakterii zarówno gram-ujemnych jak i gram-dodatnich (Rysunek 13c) [55]. Inne pochodne, a zwłaszcza 8-hydroksychinolina, ze względu na swoje właściwości kompleksujące, zdominowały pole chemosensorów jonów metali. W rzeczy samej, była ona pierwszym znanym indykátorem zastosowanym w 1968 roku do wykrywania jonów cynku w ludzkim osoczu [56]. Kolejnym przykładem jest także barwnik styrylochinolinowy zawierający w swojej strukturze ugrupowanie 2-(aminometylo)pirydyny (Rysunek 13d). Wykazuje on wielokolorową fluorescencję w zależności od rodzaju dodanego jonu metalu [57].

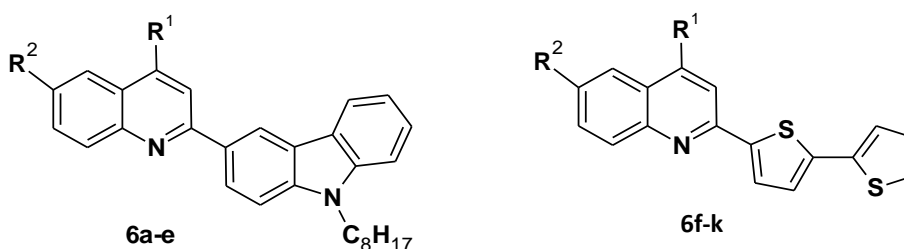


Rysunek 13. Przykłady sensorów fluorescencyjnych opartych na strukturze chinoliny.

3.2 Inspiracje oraz określenie celów syntetycznych

3.2.1 Pochodne chinoliny z ugrupowaniem karbazolowym i bitiofenowym

Inspiracją do syntezy nowych barwników komórkowych opartych na strukturze chinoliny były uprzednio przeprowadzone badania we współpracy z dr Anetą Słodek [58]. W badaniach tych poddano analizie pochodne chinoliny z ugrupowaniem karbazolowym oraz bitiofenowym zsyntezowane w Zakładzie Chemii Nieorganicznej, Metaloorganicznej i Katalizy Instytutu Chemii w Katowicach. Struktury badanych związków przedstawione są poniżej na Rysunku 14.



	a	b	c	d	e	f
R ¹	Me	Ph	Ph	Ph	Ph	Bt
R ²	H	H	Cl	NO ₂	NH ₂	H

Rysunek 14. Struktury badanych pochodnych chinoliny z ugrupowaniem karbazolowym i bitiofenowym [28].

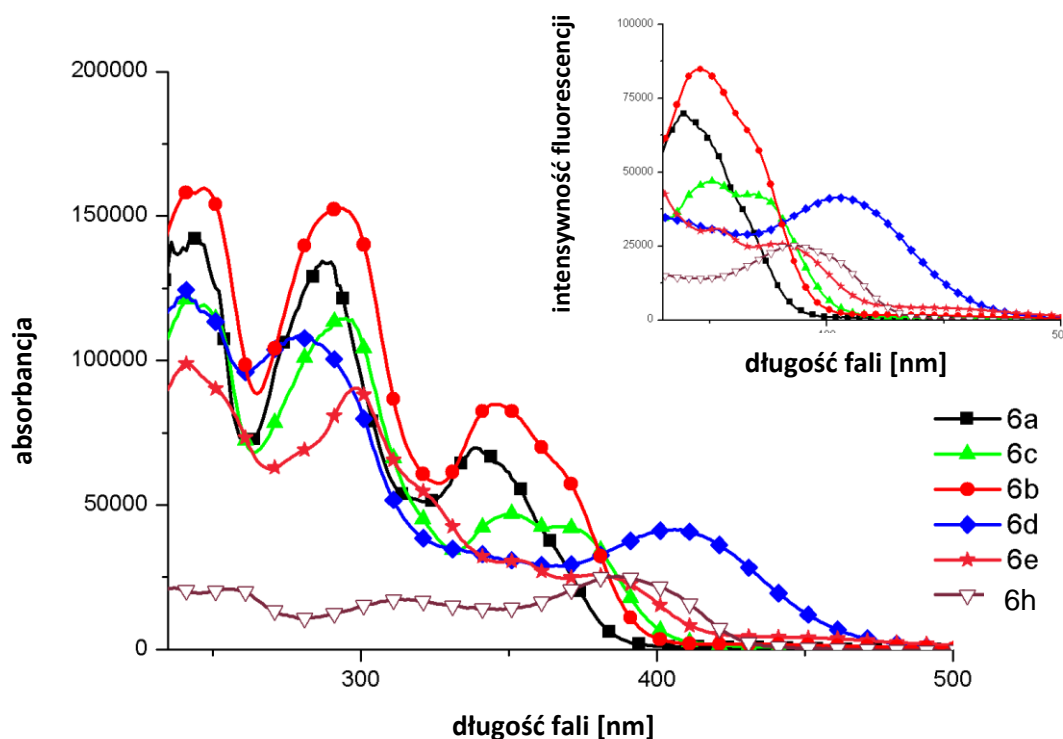
W wyniku analizy ustalono ich właściwości spektroskopowe, aktywność biologiczną oraz uzyskano zdjęcia mikroskopowe wybarwionych komórek. Widma absorpcji dla wybranych związków są przedstawione na Rysunku 15, a szczegółowe dane w Tabeli 2. Wszystkie pochodne chinoliny z ugrupowaniem karbazolowym 6a-e wykazały absorpcję w zakresie 235 – 408 nm. Uzyskano szerokie i pozbawione wyraźnej struktury pasma, co jest charakterystyczne dla związków z ugrupowaniem „push-pull” [59]. Pasma o najniższej energii, których maksima posłużyły jako fale wzbudzenia w pomiarach fluorescencji znajdowały się w większości w zakresie światła UV - 6a (339 nm), 6b (343 nm), 6c (369 nm), 6d (408 nm) i 6e (377 nm). Najdłuższą falę wzbudzenia zaobserwowano dla związku 6d (408 nm). Prawdopodobnie, przyczyną takiego przesunięcia jest mała różnica energii między orbitalami HOMO i LUMO, wynikająca z obecności silnie elektronoakceptorowej grupy NO₂

w pozycji C6 pierścienia chinolinowego. Natomiast, analizując widma absorpcyjne pochodnych z ugrupowaniem bitiofenowym (6f-k), zauważono lekkie przesunięcie batochromowe (5 – 30 nm) w stosunku do odpowiedników z ugrupowaniem karbazolowym. Wynika to z faktu, że pierścień bitiofenu jest silniejszym donorem od pierścienia karbazolu. Podobne zależności zaobserwowano w przypadku widm emisyjnych. Większość nowo zsyntezowanych związków wykazała emisję w zakresie 410 - 480 nm, co odpowiada fluorescencji światła fioletowego i niebieskiego. Wyjątkiem był związek 6d, którego maksimum widma było silnie przesunięte batochromowo w zakres odpowiadający emisji światła pomarańczowego (606 nm). Jednocześnie posiadał on największe przesunięcie Stokesa.

Tabela 2. Właściwości spektroskopowe związków 6a-6k.

Φ_{em} – wydajność kwantowa

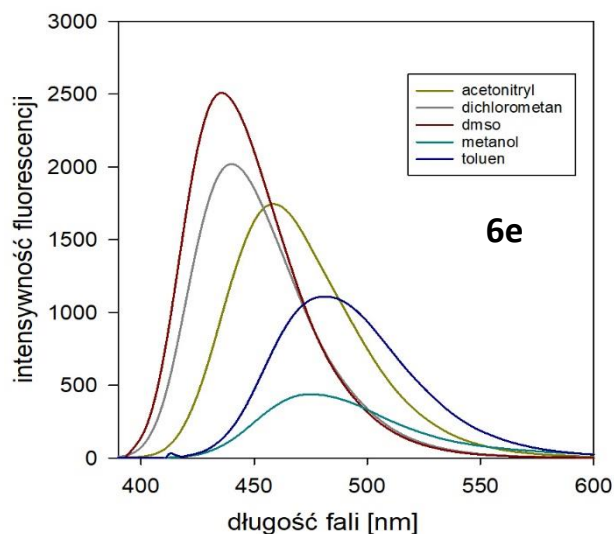
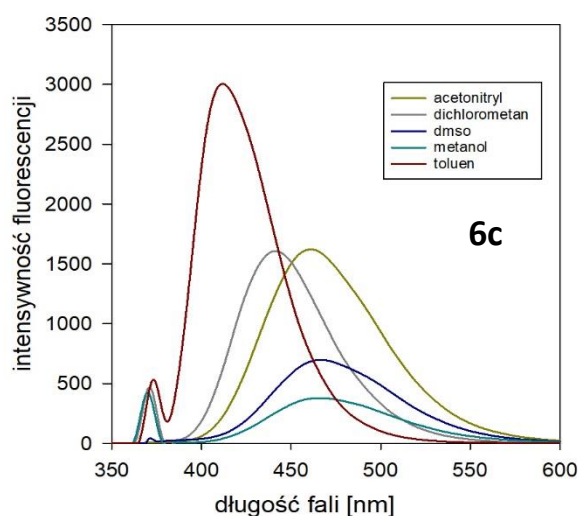
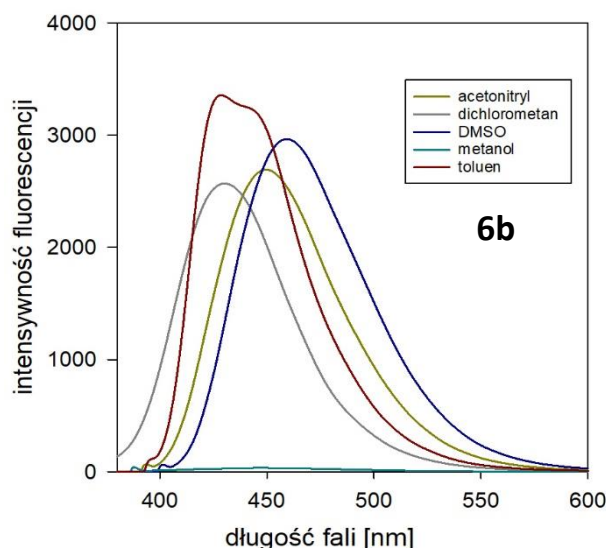
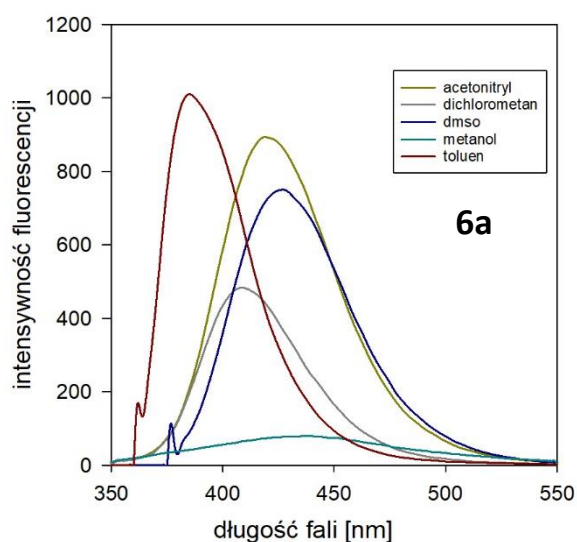
Związek	Absorpcja	Emisja	Φ_{em}
	λ [nm] (ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹])	λ [nm] / przesunięcie Stokesa[cm ⁻¹]	
6a	339 (69868)	410/5460	0,4800
6b	343 (84627)	431/6210	0,6286
6c	369 (42284)	441/4352	0,4866
6d	408 (41523)	606/8190	0,0905
6e	377 (25944)	440/3588	0,7026
6f	373 (55014)	444/4287	0,1830
6g	377 (67335)	450/4303	0,4377
6h	386 (24643)	460/4167	0,4206
6i	412 (68146)	595/7465	0,3187
6j	400 (37143)	466/3541	0,2333
6k	380 (80717)	479/5439	0,5273

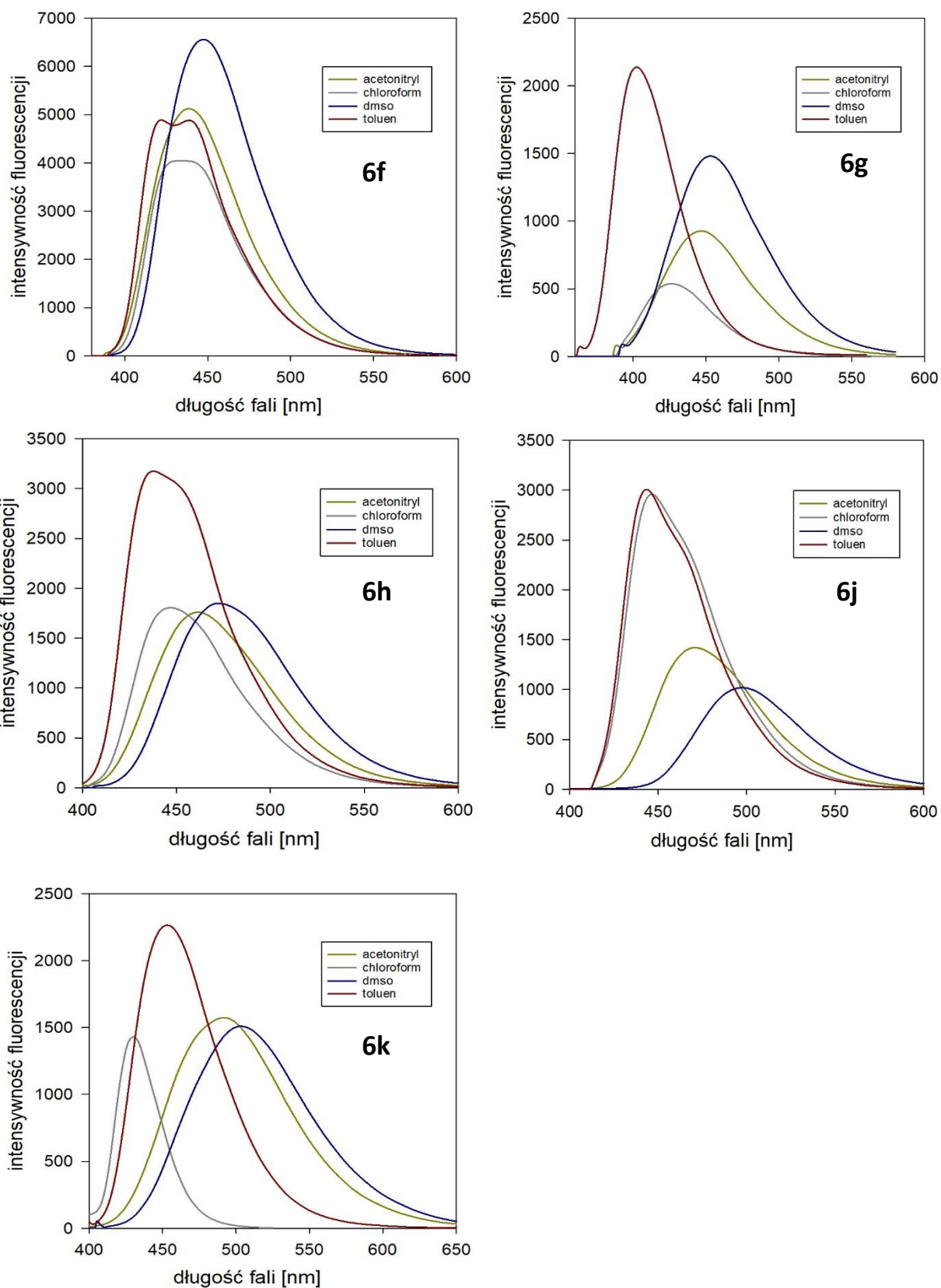


Rysunek 15. Widma absorpcji związków 6a-f oraz 6h.

Częścią charakterystyki spektralnej było także zmierzenie wydajności kwantowych fluorescencji badanych związków przy wykorzystaniu sfery integrującej. Pomiarów dokonała dr Aneta Słodek z Zakładu Chemii Nieorganicznej UŚ. Z wyłączeniem związku 6d, pochodne karbazolowe wykazały obiecującą wydajność kwantową w zakresie 48 – 70% (Tabela 2). Najmniejsze przesunięcie Stokesa zaobserwowano dla związku 6e, który w przeciwieństwie do związku 6d, posiada grupę elektronodonorową $-NH_2$. Ta natomiast poprzez zwiększenie gęstości elektronowej w pierścieniu chinoliny destabilizuje stan wzbudzony, przez co maksimum emisji przesunęło się w stronę fal krótszych (o wyższej energii). Związki 6a-k były dodatkowo zbadane pod kątem solwatochromizmu. Do pomiarów użyto więc rozpuszczalników o różnej polarności takich jak: metanol, DMSO, chloroform (CH_3Cl), dichlorometan (DCM), acetonitryl (ACN) i toluen. Wyniki tych pomiarów przedstawione są na Rysunku 16 oraz w Tabeli 3. Wszystkie badane związki wykazały pozytywny solwatochromizm, co oznacza, że wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika, pasmo emisji przesunęło się w stronę fal dłuższych. Jedynie w przypadku metanolu zaobserwowano przesunięcie batochromowe znacznie większe niż wynikałoby to z indeksu polarności. Jednak,

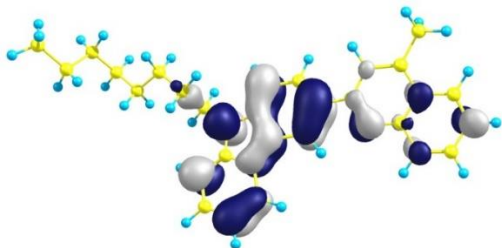
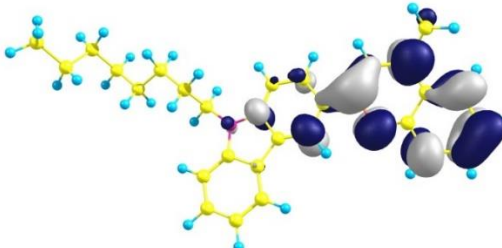
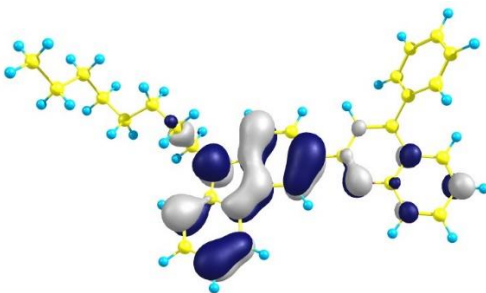
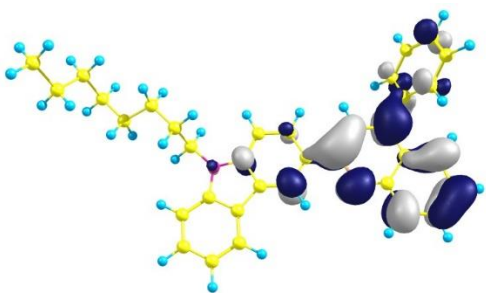
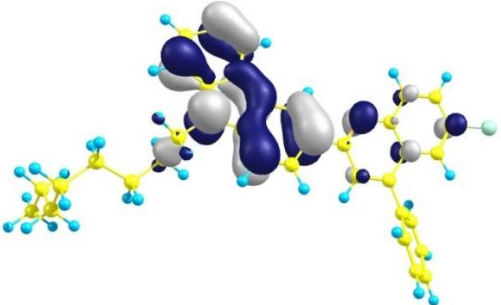
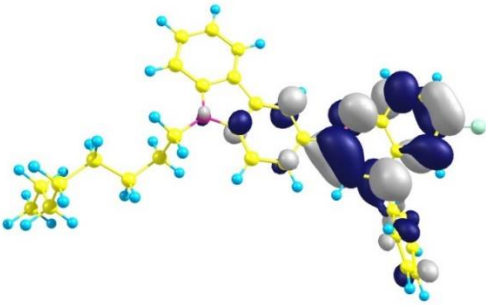
metanol jako protyczny rozpuszczalnik wprowadza dodatkowy czynnik jakim są wiązania wodorowe, które odgrywają znaczącą rolę w tego typu oddziaływaniach. Stwierdzono, że obserwowany silny wpływ polarności rozpuszczalnika na emisję może wskazywać na obecność stanu wzbudzonego z przeniesieniem ładunku (typu „charge – transfer”). W wyniku zmiany momentu dipolowego w stanie wzbudzonym, wokół cząsteczki zachodzi relaksacja (reorganizacja) cząstek rozpuszczalnika. To natomiast, jest przyczyną emisji o dłuższych długościach fal oraz wzrostu wartości przesunięcia Stokesa. Przebadane związki wykazały także różnicę w intensywności procesu fluorescencji w zależności od rodzaju rozpuszczalnika. Co interesujące, najsilniejszą fluorescencję zaobserwowano w niepolarnym rozpuszczalniku jakim był toluen. Następnie, wraz ze wzrostem polarności intensywność emisja malała, a w protycznym rozpuszczalniku (metanol) została silnie stłumiona.

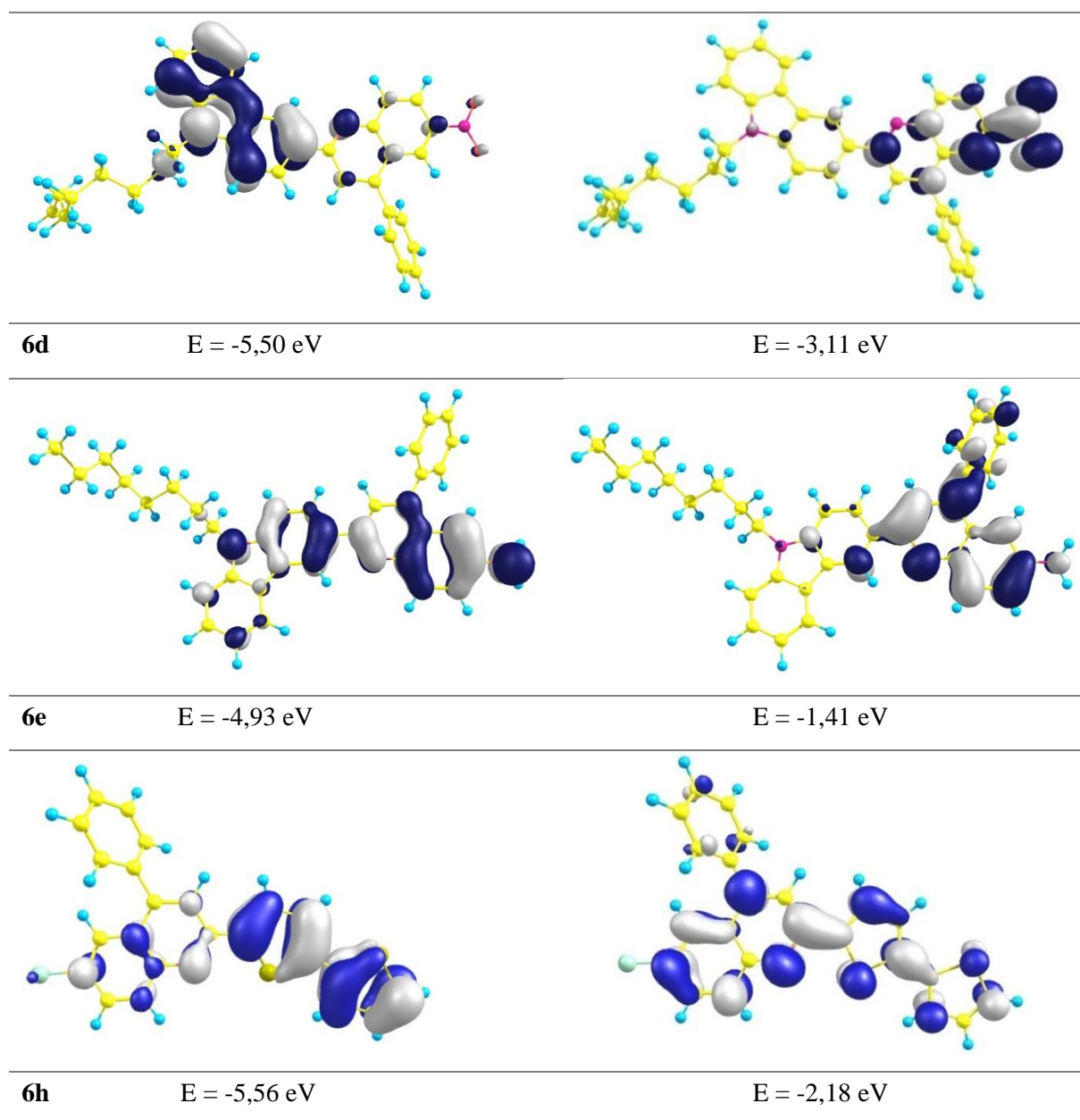




Rysunek 16. Wykresy przedstawiające zmiany fluorescencji wybranych związków w zależności od polarności rozpuszczalnika.

W celu wyjaśnienia obserwowanych efektów spektroskopowych otrzymanych związków, badania były wsparte obliczeniami teoretycznymi. W tym przypadku, obliczenia kwantowe zostały wykonane w Zakładzie Chemii Teoretycznej Uniwersytetu Śląskiego. Takie podejście pozwoliło na zebranie informacji na temat rodzaju przejść elektronowych oraz zaangażowanych w nie orbitali, czy zmian zachodzących w cząsteczce po wzbudzeniu. Rysunek 17 przedstawia wizualizacje orbitali granicznych HOMO i LUMO, z których wynika, że we wzbudzeniu bierze udział ugrupowanie karbazolowe (jako donor) oraz pierścień chinoliny (jako akceptor). Przejście to scharakteryzowano więc jako przejście $\pi_{\text{karbazol}} \rightarrow \pi^*_{\text{chinolina}}$. Przeprowadzone obliczenia potwierdziły także proces przeniesienia ładunku, co łatwo zaobserwować na załączonym rysunku (Rysunek 17).

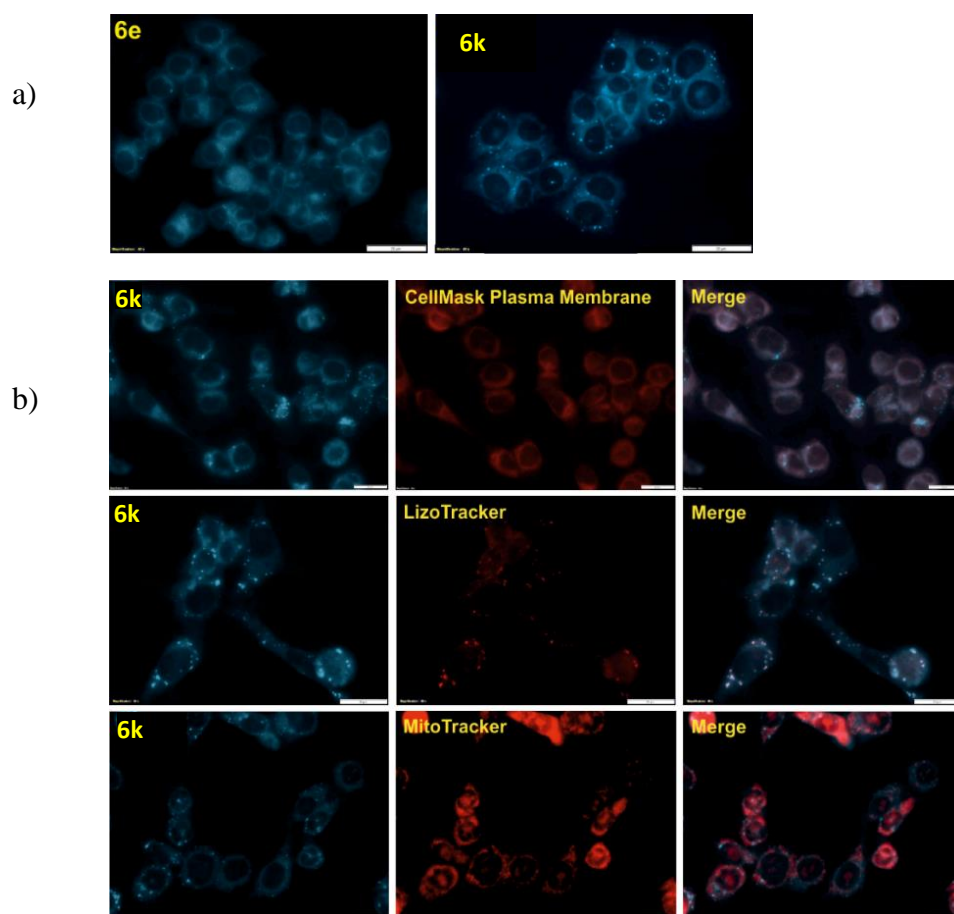
	HOMO	LUMO
6a	 E = -5,25 eV	 E = -1,49 eV
6b	 E = -5,33 eV	 E = -1,63 eV
6c	 E = -5,39 eV	 E = -1,83 eV



Rysunek 17. Wizualizacja orbitali granicznych HOMO i LUMO badanych związków.

Ważną cechą dobrego chemosensora jest brak toksyczności wobec układów biologicznych (komórki, organizmy). W celu określenia tych właściwości przeprowadzono podstawowe oznaczenia, które zawierały badania cytotoksyczności na komórkach nowotworowych. Otrzymane związki nie wykazały żadnej toksyczności w zakresie stężeń użytecznym dla badanych zastosowań. Pomimo ciekawych właściwości spektroskopowych oraz braku cytotoksyczności, nie można ich było jednak zaliczyć do efektywnych barwników komórkowych, gdyż nie obserwowano wystarczająco silnego sygnału po wzbudzeniu w komórkach. Na ostateczny efekt w komórce ma wpływ nie tylko wydajność kwantowa

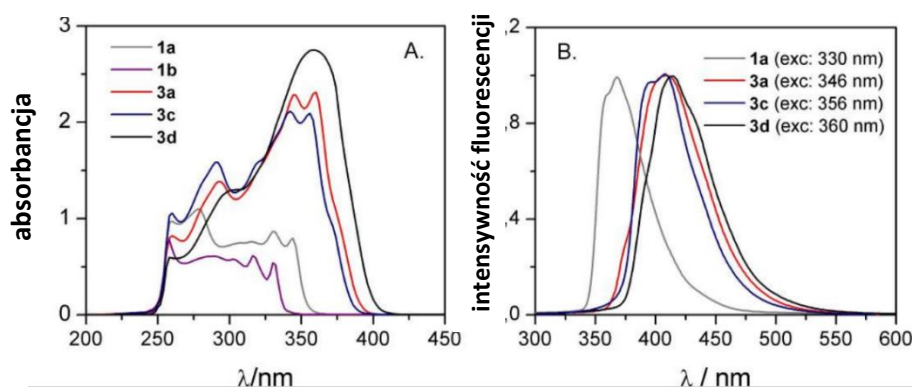
barwnika i jego zakres absorpcji i fluorescencji, ale także właściwości farmakokinetyczne jak wiązanie białek czy metabolizm. Istnieje także wiele czynników wygaszających fluorescencję. Znaczenie ma również fakt, że związki wykazywały najsilniejszą emisję w środowisku niepolarnym, podczas gdy naturalnym środowiskiem komórki jest środowisko wodne. Dlatego, z całej grupy wyselekcjonowano tylko dwa związki 6e oraz 6k, które następnie użyto do wybarwienia struktur komórkowych (Rysunek 18). Tym samym ustalono miejsce kumulacji sensora 6k w komórkach techniką współbarwienia i mikroskopii fluorescencyjnej. Badania te zostały wykonane we współpracy z dr Katarzyną Malarz. Stwierdzono, że związek 6k gromadzi się w strukturach lipofilowych takich jak błona komórkowa czy mitochondrium, co wynika z jego budowy oraz względnie wysokiej lipofilowości ($cLogP=7,73$).



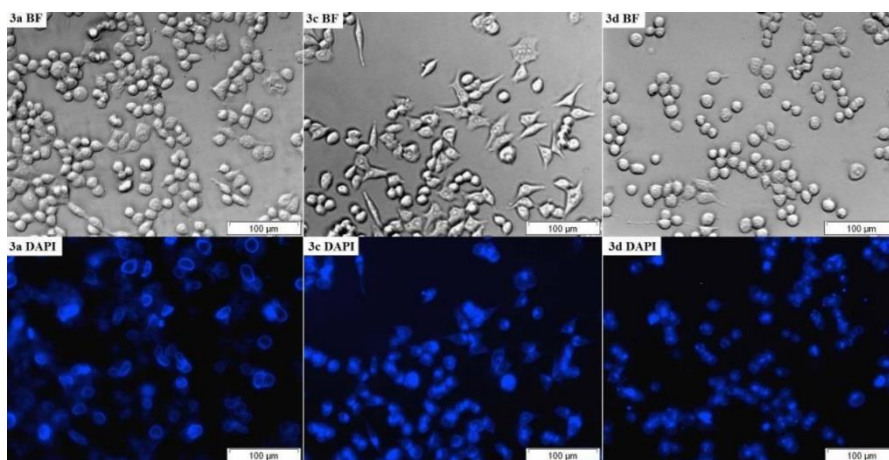
Rysunek 18. a) Komórki nowotworowe raka jelita grubego (linia HCT 116) wybarwione związkami 6e i 6k; b) Badanie kolokalizacji związku 6k w przykładowych organellach komórkowych gdzie: CellMask Plasma Membrane – barwnik selektywny dla błony komórkowej; LysoTracker – barwnik selektywny dla lizosomów; MitoTracker – barwnik selektywny dla mitochondriów; Merge – obrazy nałożone

3.2.2 Styrylochinoliny jako potencjalne fluorofory

Badania w Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Śląskiego od wielu lat skupiają się na syntezie i analizie pochodnych chinoliny. W większości obejmują one badania aktywności biologicznej nowo otrzymanych związków [60][61][62]. Jednakże, w 2015 roku powstała publikacja opisująca właściwości fluorescencyjne grupy styrylochinolin (Rysunek 19) oraz ich zastosowanie do wybarwiania komórek nowotworowych raka jelita grubego (linia HCT 116) (Rysunek 20) [63]. Otrzymane związki posiadały zadowalające wydajności kwantowe (największa 0.32), które pozwoliły na ich wzbudzenie w komórce pod mikroskopem. Wykazywały jednak niskie fale wzbudzenia (330 nm - 360 nm), co znacznie zmniejsza ich potencjał aplikacyjny jako barwniki komórkowe. Dodatkowo, przesunięcie Stokesa, choć zadowalające (20 – 60 nm), w niektórych przypadkach wymagałoby udoskonalenia. Przedstawione badania prezentują jednak styrylochinolinę jako obiecującą potencjalną jednostkę fluoroforową.



Rysunek 19. Widma przedstawiające charakterystykę spektralną grupy styrylochinolin.



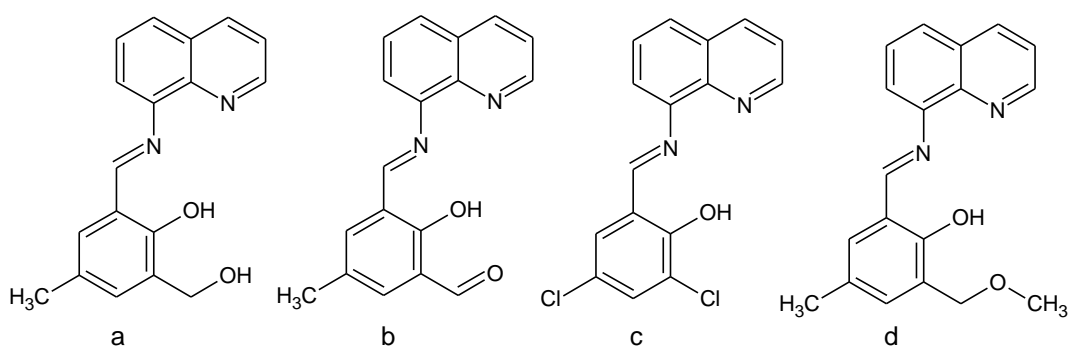
Rysunek 20. Rysunek przedstawiający komórki linii HCT116 wybarwione za pomocą otrzymanych styrylochinolin.

3.3 Zasady Schiffa oparte na strukturze styrylochinoliny

Opierając się na uzyskanych wynikach oraz na doświadczeniu zespołu w badaniu pochodnych chinolinowych, postanowiono zsyntezować grupę związków, które wykazywałyby większą efektywność fluorescencji w strukturach komórkowych. Skupiono także uwagę na poszukiwaniu potencjalnych fluorescencyjnych sensorów cynku. W tym celu zaprojektowano nową grupę styrylochinolin z przedłużonym układem sprzężonych wiązań podwójnych dzięki dodatkowemu wiązaniu C=N, charakterystycznemu dla zasad Schiffa.

3.3.1 Zasady Schiffa

Zasady Schiffa znane są głównie ze względu na swoje szerokie spektrum aktywności biologicznej. Wykorzystywane są jako jednostki przeciwgrzybicze, przeciwbakteryjne, przeciwmalaryczne czy przeciwwirusowe [64][65][66]. Z drugiej strony, możemy znaleźć doniesienia o ich zastosowaniu jako sensory pH lub sensory jonów metali [67][68]. Szczególną uwagę zdobyły w ostatnim czasie związki oparte na strukturze 8 – aminochinoliny, jednocześnie zawierające wiązanie iminowe. Sensory te wykorzystano do wykrywania jonów cynku Zn^{2+} z zadowalającą selektywnością, nawet w obecności jonów kadmu Cd^{2+} , które ze względu na położenie w układzie okresowym wykazują podobne właściwości do jonów cynku. Niektóre struktury wspomnianych barwników przedstawione są na Rysunku 21.

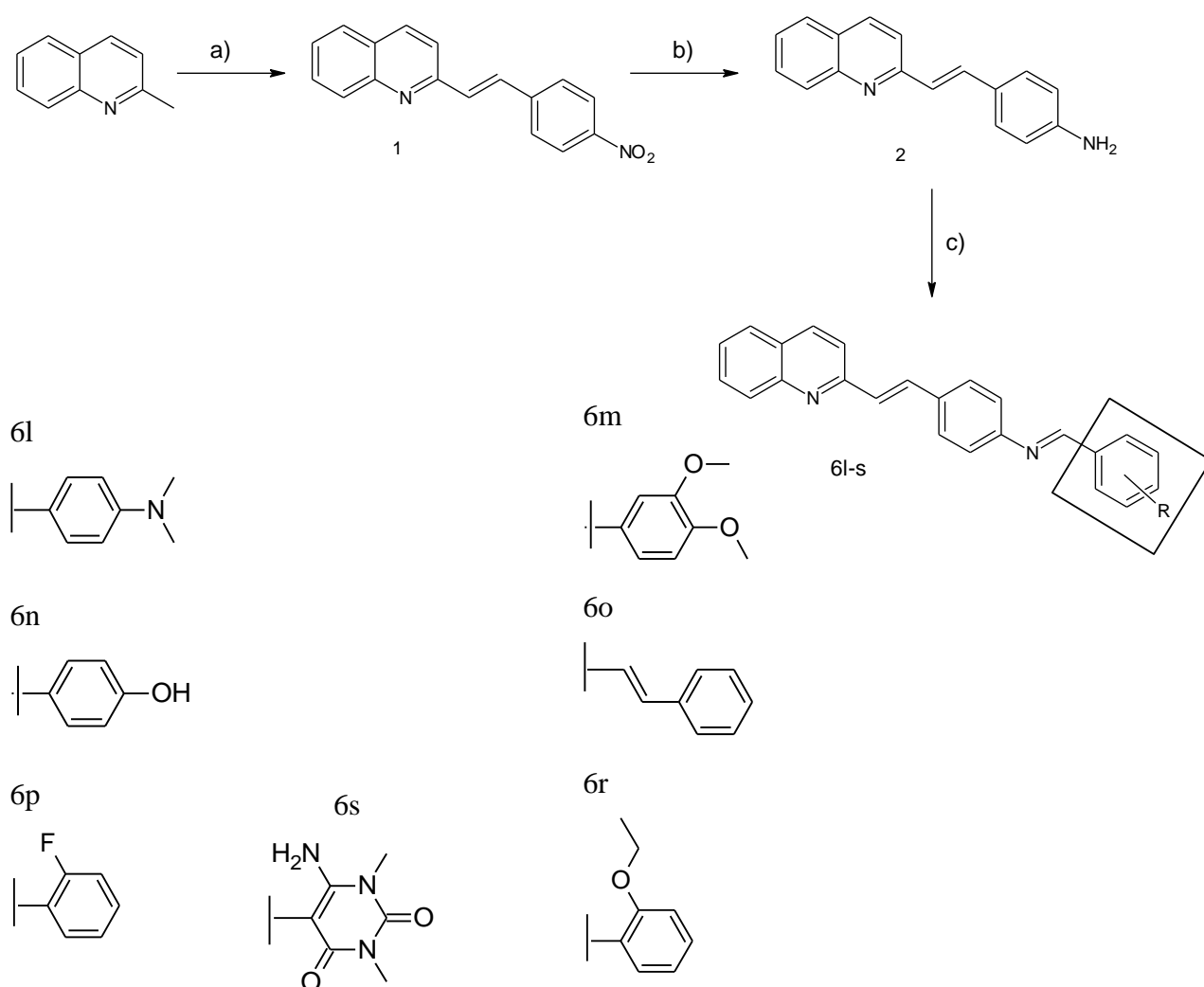


Rysunek 21. Struktury przykładowych sensorów cynku Zn^{2+} , zawierających w swej budowie wiązanie iminowe. Poszczególne związki opisane są w następujących publikacjach (a) – [69], (b) – [70], (c) – [71], (d) – [72]

Pomimo, że iminy wciąż są dość rzadko wykorzystywane w barwieniu fluorescencyjnym, właściwości wiązania C=N takie jak dipolowy charakter oraz zdolność do takich procesów jak izomeryzacja, ESIPT czy ICT, czynią je interesującymi obiektami badań.

3.3.2 Otrzymywanie oraz analiza strukturalna badanych zasad Schiffa

Wszystkie pochodne styrylochinoliny otrzymane zostały w wyniku trzyetapowej reakcji (Rysunek 22).

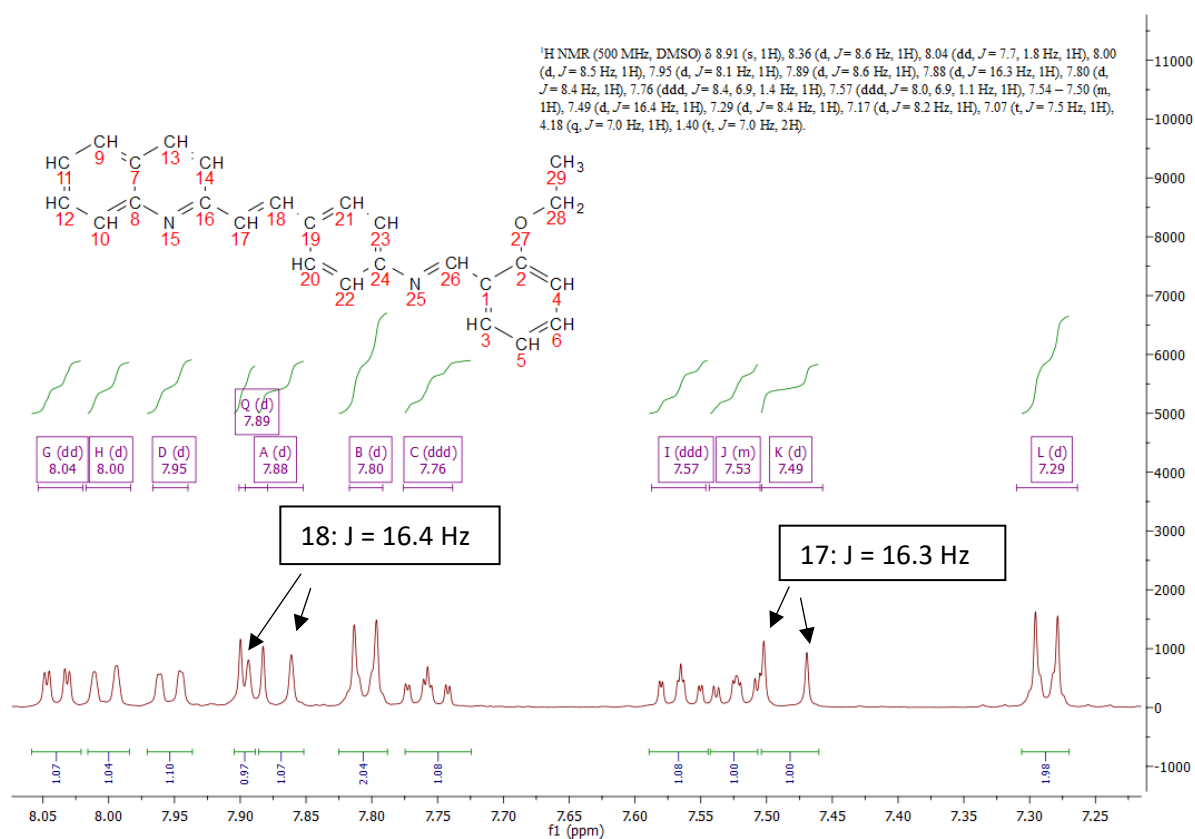


Rysunek 22. Ścieżka syntezy nowych zasad Schiffa. Odczynniki i warunki reakcji: a) 4-nitrobenzaldehyd/ Ac_2O , b) $\text{SnCl}_2/\text{EtOH}$, c) aldehyd aromatyczny/ EtOH

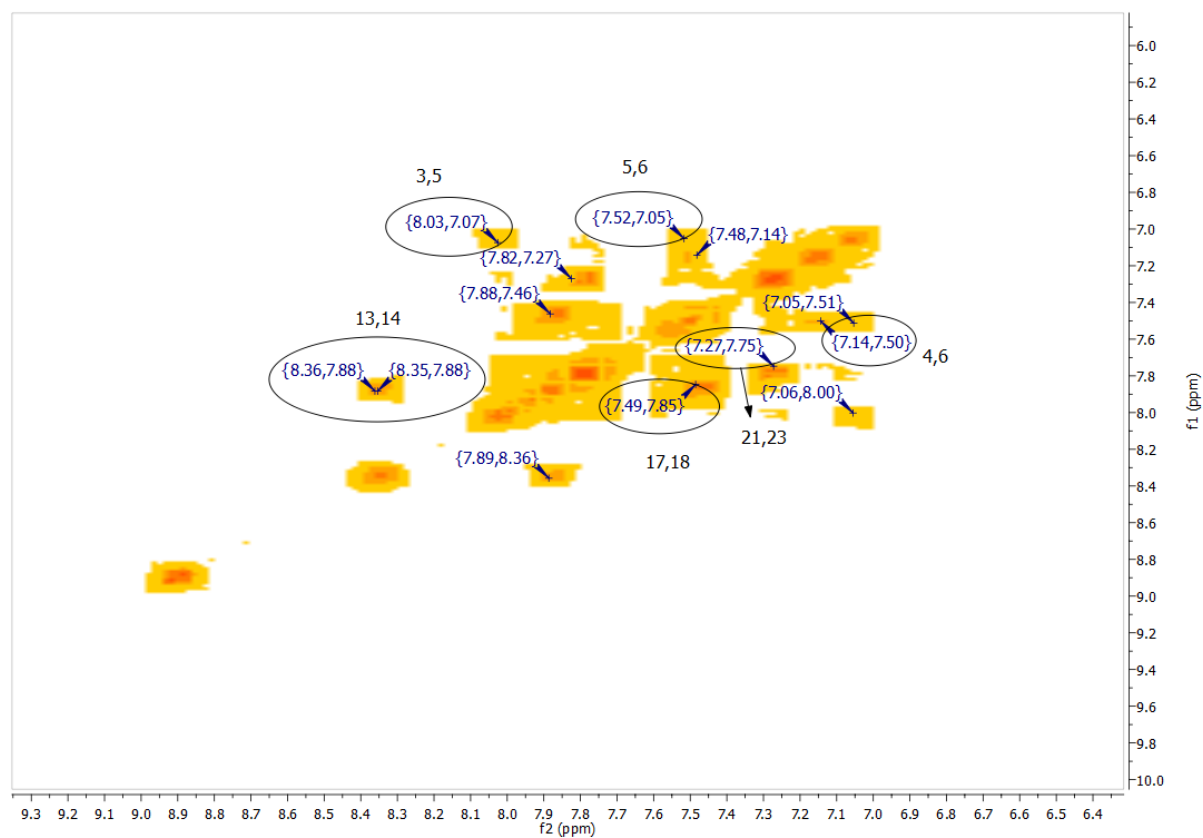
Pierwszy etap reakcji polegał na kondensacji chinaldyny z aldehydem 4-nitrobenzoesowym w środowisku wrzącego bezwodnika octowego. Produkt tej reakcji poddano wstępnej krystalizacji oraz przeprowadzono rozdział chromatograficzny w celu dokładnego oczyszczenia związku. Następnym etapem było przeprowadzenie redukcji grupy nitrowej otrzymanej 2-(4-nitro-*E*-styrylochinoliny). W tym celu zastosowano bezwodny chlorek cyny (II) (w stosunku molowym 1:5) jako czynnik redukujący w środowisku etanolu i w obecności gazu obojętnego. Uzyskana w ten sposób pochodna z grupą aminową, służyła jako wyjściowy związek w ostatnim etapie syntezy. Finałowe zasady Schiffa uzyskano w wyniku kondensacji 2-(4-amino-*trans*-styrylochinoliny) z odpowiednimi aldehydami aromatycznymi w warunkach pola mikrofalowego, z użyciem etanolu jako rozpuszczalnika oraz kilku kropel kwasu octowego jako katalizatora. Ta metoda pozwoliła na znaczne skrócenie czasu reakcji oraz otrzymanie zadowalająco czystych produktów, które wydzielono na drodze krystalizacji. Otrzymane w ten sposób pochodne styrylochinoliny poddano dalszej analizie.

Należy zwrócić uwagę na fakt, że powstałe związki mogą występować w postaci izomerów *E* lub *Z*, zarówno, ze względu na obecność wiązania podwójnego w ugrupowaniu styrylochinolinowym, jak i obecność wiązania iminowego. Na podstawie poprzednich badań opisanych w rozprawie doktorskiej dr Wiolety Cieślik, gdzie zamieszczono wnikliwą analizę strukturalną otrzymanych w ten sam sposób styrylochinolin, można określić konfigurację pierwszego wiązania podwójnego C=C [73]. Otóż, izomery *E* i *Z* można rozróżnić za pomocą metod spektroskopii NMR. Ustalono do tej pory, że wodory konfiguracji *Z* posiadają wartości stałej sprzężenia w zakresie 10 – 12 Hz. Natomiast, dla wodorów w położeniu *E*, wartości te mieszczą się w wyższym zakresie tj. od 12 do 18 Hz. Na widmie NMR jednego z otrzymanych związków (6r) można znaleźć stałe sprzężenia 16,3 Hz i 16,4 Hz dla dubletów przypisanych do atomów wodoru wiązania podwójnego C=C, co świadczy o obecności izomeru *E* (Rysunek 23).

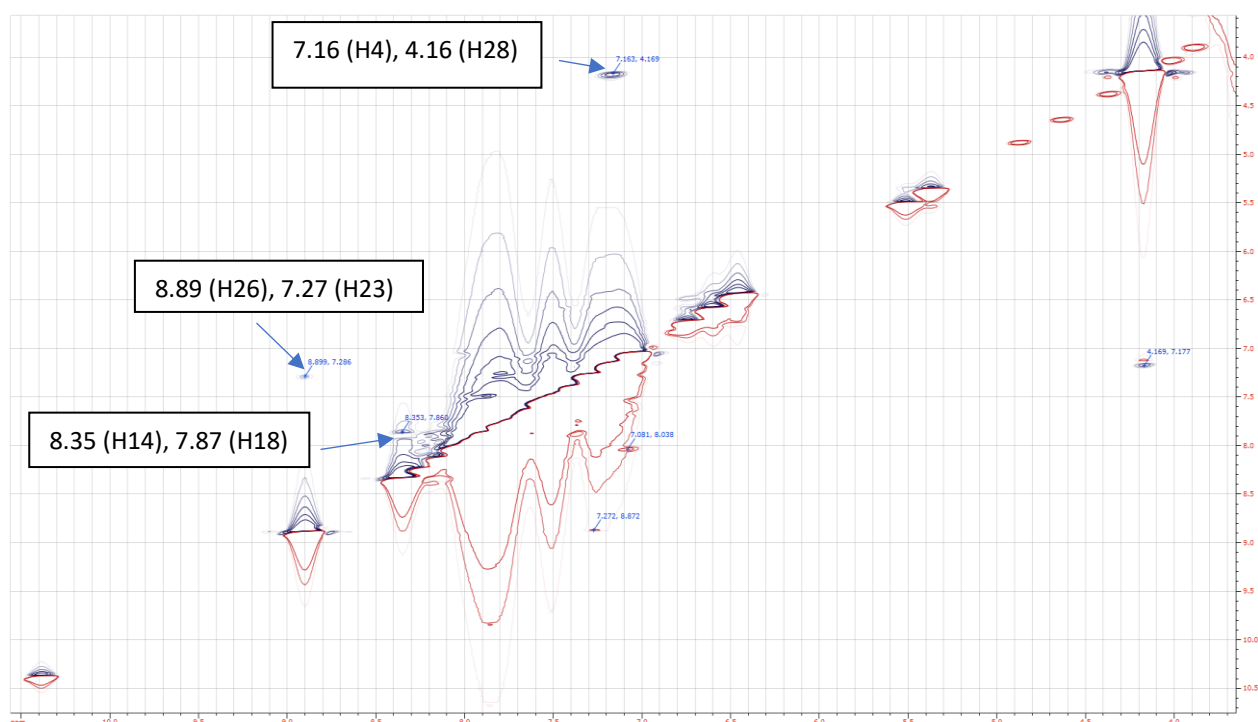
Trudniejszym zagadnieniem w tym przypadku było ustalenie konfiguracji wiązania C=N. W celu uzyskania większej ilości danych wykonano więc dodatkowo widma dwuwymiarowe COSY (Rysunek 24) oraz NOESY (Rysunek 25), dzięki czemu przypisano resztę sygnałów do poszczególnych protonów. Jednocześnie, największą uwagę skupiono na sygnale pochodzącym od protonu wiązania iminowego, jako że jego położenie w przestrzeni determinuje rodzaj konfiguracji.



Rysunek 23. Widmo ¹H NMR związku 6r.

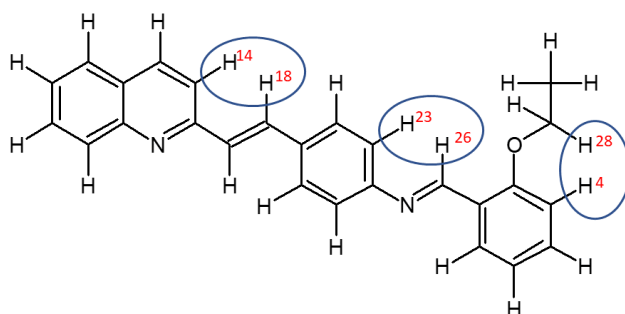


Rysunek 24. Widmo COSY związku 6r.



Rysunek 25. Widmo NOESY związku 6r.

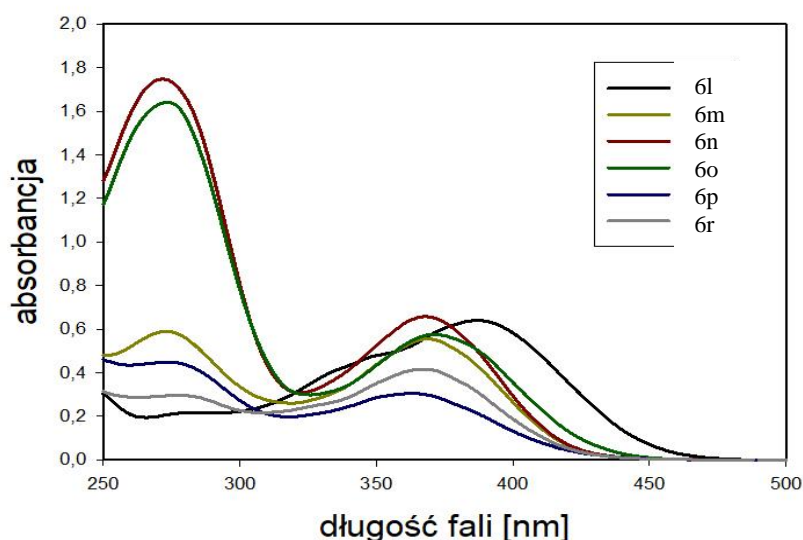
Po dogłębnej analizie widma NOESY ustalono sygnały korelacyjne między protonami leżącymi blisko siebie w przestrzeni. Mianowicie, zaobserwowano następujące sprzężenia: proton H14 i H18, co potwierdziło konfigurację E w przypadku wiązania podwójnego C=C czy proton H4 i H28, co pomogło przypisać odpowiednie sygnały w pierścieniu fenylowym. Z punktu widzenia konfiguracji wiązania C=N najważniejszym sygnałem jest sprzężenie protonów H26 (pierścień fenyłowy jednostki styrylochinolinowej) i H23 (proton wiązania iminowego). Ich bliskie ułożenie w przestrzeni wskazuje na występowanie konfiguracji E wiązania C=N (Rysunek 26). Analogiczne sygnały można znaleźć na widmach spektroskopowych pozostałych związków.



Rysunek 26. Rysunek przedstawiający ustaloną konfigurację E wiązania C=N związku 6r.

3.3.3 Charakterystyka spektralna pochodnych styrylochinolinowych

W celu otrzymania charakterystyki spektralnej zsyntezowanych związków, dokonano pomiarów widm absorpcji i emisji z wykorzystaniem spektroskopii UV-VIS. Aby otrzymać szerszy zakres zależności tych procesów od warunków w jakich zachodzą, pomiary przeprowadzono w rozpuszczalnikach o różnej polarności i zdolności do tworzenia wiązań wodorowych. Otrzymane wyniki pomiarów przeprowadzonych w etanolu zamieszczono w Tabeli 4. Widma absorpcji związków 6l-6r (Rysunek 27) składają się z dwóch pasm, z czego pierwsze mieści się w zakresie 250 - 300 nm, a drugie posiada swoje maksimum powyżej 360 nm. Jest to bardzo ważna właściwość z punktu widzenia zastosowania otrzymanych związków jako barwników do obrazowania komórkowego. Długości fal poniżej 350 nm niosą ze sobą wystarczająco dużo energii aby uszkodzić strukturę białek, zakłócając proces obserwacji, tym samym uniemożliwiając eksperymenty wymagające większej ilości czasu [74]. Długości fali promieniowania wzbudzającego powyżej 360 nm pozwalają też uniknąć zjawiska autofluorescencji spowodowanego obecnością naturalnie występujących cząsteczek, których profil wzbudzenia obejmuje fale o wyższej energii takie jak 270 nm (tyrozyna) [75], 280 nm (tryptofan) [76] czy 340 nm (NAD(P)H) [77]. W wyniku analizy widm absorpcji badanych związków zaobserwowano zależność między strukturą a przesunięciem pasma. Największe przesunięcie batochromowe (w kierunku fal dłuższych) odnotowano dla związku 6l, który posiada silną grupę elektrodonorową ($N(CH_3)_2$). Następnie, wraz ze spadkiem charakteru elektrodonorowego podstawników obecnych w pierścieniu fenylowym, obserwowano efekt hipsochromowy (przesuwanie się pasm w stronę fal krótszych), w szeregu 6l>6n>6m>6r>6p.



Rysunek 27. Widma absorpcyjne nowo zsyntezowanych zasad Schiffa 6l-r zmierzone w etanolu (stężenie badanej próbki: $1,25 \times 10^{-5}$ mol/dm³)

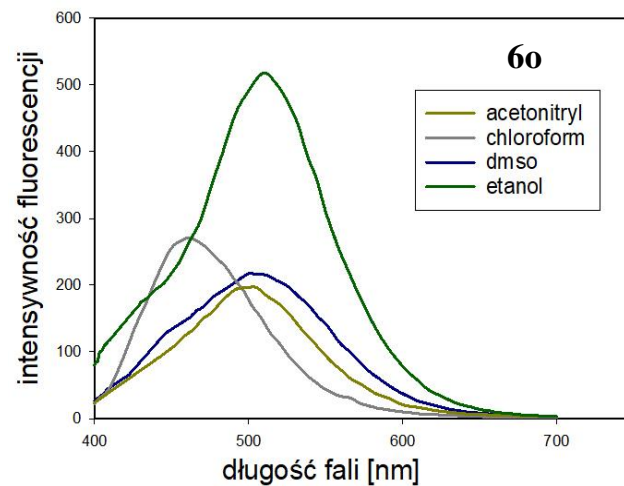
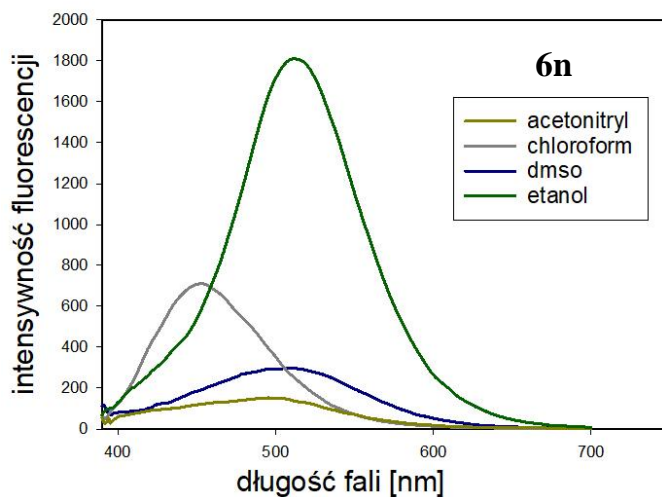
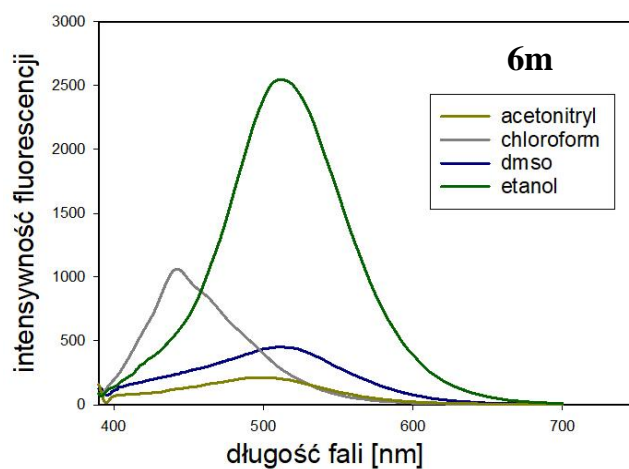
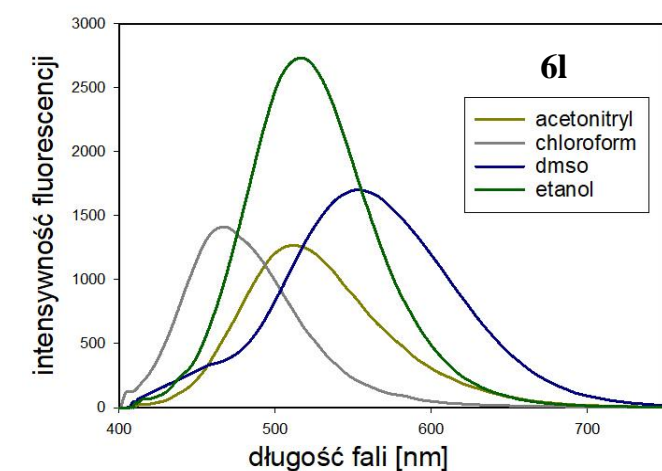
Tabela 4. Tabela przedstawiająca charakterystykę spektralną nowo zsyntezowanych zasad Schiffa 6l-r. Pomiarów dokonano w etanolu, przy stężeniu badanej próbki $1,25 \times 10^{-5}$ mol/dm³ w przypadku absorpcji oraz $6,2 \times 10^{-6}$ mol/dm³ w przypadku emisji. Wydajności kwantowe zmierzone zostały przy użyciu sfery integrującej we współpracy z dr Anetą Słodek.

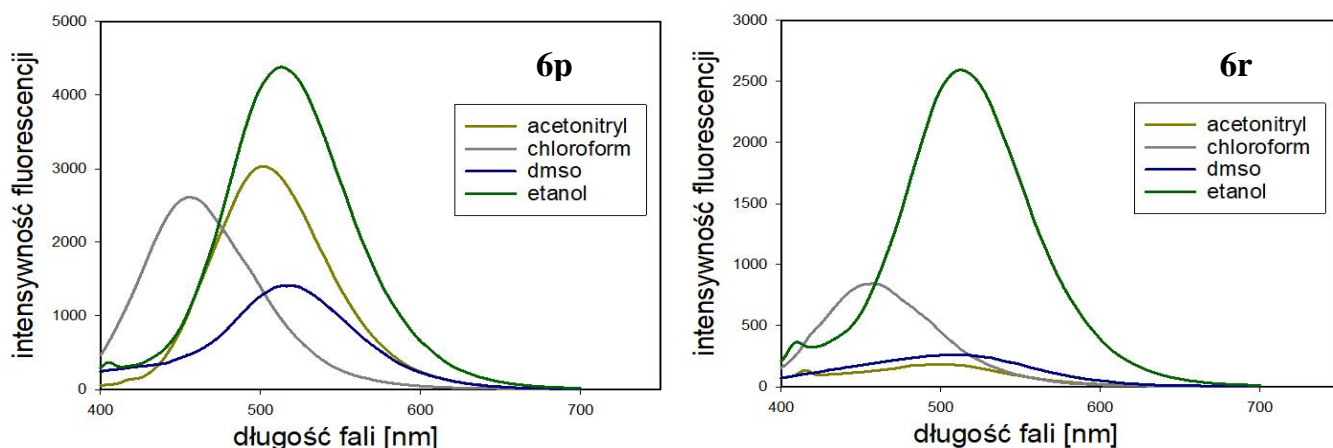
związek	Absorpcja	Emisja		przesunięcie Stokesa nm/cm ⁻¹
	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	ϕ	
6l	388	519	0,041	131/6505
	336			
6m	368	512	0,054	144/7642
	276			
6n	370	514	0,052	144/7571
	272			
6o	372	512	0,034	140/7350
	274			
6p	362	514	0,058	152/8169
	270			
6r	366	514	0,079	148/7867
	272			

Widma emisyjne badanych związków obejmują zakres 400 - 600 nm, z maksimum między 512 - 519 nm, co odpowiada fluorescencji światła niebiesko-zielonego. Podobnie jak w przypadku widm absorpcyjnych, pomiarów dokonano w różnych rozpuszczalnikach. Otrzymane dane przedstawiono w Tabeli 5 poniżej, a wszystkie widma zaprezentowano na Rysunku 28. Podczas gdy polarność środowiska nie miała znaczącego wpływu na maksima absorpcji, w przypadku emisji zauważono znaczne różnice w przesunięciach widm w zależności od użytego rozpuszczalnika. Najlepsze własności fluorescencyjne zaobserwowano w etanolu – pasma są najintensywniejsze oraz najbardziej przesunięte batochromowo. Natomiast w DMSO oraz acetonitrylu, w większości przypadków intensywność fluorescencji gwałtownie spada, a w chloroformie widma są znacznie przesunięte hipsochromowo.

Tabela 5. Właściwości solwatochromiczne zasad Schiffa 6l-r. S – przesunięcie Stokesa

związek	chloroform			Acetonitryl			DMSO			etanol		
	λ_{abs} nm	λ_{em} nm	S nm/cm ⁻¹	λ_{abs} nm	λ_{em} nm	S nm/cm ⁻¹	λ_{abs} nm	λ_{em} nm	S nm/cm ⁻¹	λ_{abs} nm	λ_{em} nm	S nm/cm ⁻¹
6l	386	467	81/4493	387	513	126/6346	400	557	157/7046	388	519	131/6505
6m	370	450	80/4804	370	500	130/7027	374	511	137/7168	368	512	144/7642
6n	368	454	86/5147	367	502	135/7327	374	510	136/7130	370	514	144/7571
6o	374	458	84/4904	372	500	128/6881	382	512	130/6646	372	512	140/7350
6p	362	456	94/5694	364	501	137/7512	370	516	146/7647	362	514	152/8169
6r	370	459	89/5240	368	500	132/7174	374	507	133/7014	366	514	148/7867





Rysunek 28. Wykresy przedstawiające zmiany fluorescencji związków 6l-r w zależności od polarności rozpuszczalnika. Pomiarów dokonano przy stężeniu badanej próbki $1,25 \times 10^{-5}$ mol/dm³.

Badane związki charakteryzują się bardzo dużymi wartościami przesunięć Stokesa. Wśród pomiarów przeprowadzonych w etanolu, najmniejsze przesunięcie Stokesa zaobserwowano dla związku 6l - 131 nm (6505 cm^{-1}), a największe dla związku 6p - 152 nm (8169 cm^{-1}). Tak wysokie wartości są często spowodowane występowaniem konkretnych procesów w stanie wzbudzonym np. ESIPT (z *ang.* excited state intramolecular proton transfer; wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie protonu) czy ICT (z *ang.* intramolecular charge transfer; wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku) [4]. Niestety często, duża różnica między pasmami absorpcji i emisji jest związana jednocześnie z niską wydajnością kwantową. Wartości wydajności kwantowych otrzymane dla badanych związków zamieszczone są w Tabeli 4. Najwyższą wydajność kwantową zaobserwowano dla związku 6r i wynosi 0,079. Reszta związków charakteryzuje się podobną efektywnością fluorescencji posiadając wydajność ok 0,05. Natomiast najslabiej fluoryzującą cząsteczką jest związek 6o z wydajnością 0,034. Uzyskane dane ukazały więc, że proces emisji badanych związków jest silnie zależny od polarności rozpuszczalnika. Dodatkowo, zmiany w przesunięciach pasm wykazują pewną prawidłowość (tak samo jak w przypadku opisanych wyżej pochodnych karbazolowych), która określana jest jako pozytywny solwatochromizm. Innymi słowy, wzrost polarności rozpuszczalnika powoduje przesunięcie pasma emisji w stronę fal dłuższych, co jednocześnie przekłada się na wzrost wartości przesunięcia Stokesa. Najprawdopodobniej wynika to ze znacznej różnicy w momentach dipolowych stanu podstawowego i stanu wzbudzonego. Zarówno stan podstawowy, jak i stan wzbudzony cząsteczki jest stabilizowany mniej lub

bardziej oddziaływaniami z otaczającym ją rozpuszczalnikiem. Gdy w wyniku wzbudzenia następuje zmiana w rozkładzie gęstości elektronowej fluorofora, dochodzi do tzw „relaksacji rozpuszczalnika”, czyli rotacji cząsteczek rozpuszczalnika wokół wzbudzonej molekuly, do momentu uzyskania równowagi termodynamicznej. Proces ten jest także nazywany z ang. „solvent cage effect” [5]. Zmiana w momencie dipolowym jest rezultatem wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia ładunku ICT, który został dokładniej opisany w następnym rozdziale. W przypadku związków heterocyklicznych, wzrost intensywności fluorescencji w etanolu można też wyjaśnić w dodatkowy sposób. Ze względu na obecność atomu azotu w pierścieniu, najniższym przejściem energetycznym jest przejście $n \rightarrow \pi^*$, co tłumaczy niską wydajność kwantową np. w chloroformie. Sytuacja ulega zmianie w rozpuszczalniku protycznym, np. w alkoholu, gdzie możliwe jest utworzenie wiązania wodorowego między atomem azotu a cząsteczkami rozpuszczalnika. Następuje wtedy inwersja najniższych poziomów energetycznych $n \rightarrow \pi^*$ i $\pi \rightarrow \pi^*$, co powoduje wzrost intensywności emisji. Co więcej, w stanie wzbudzonym maleje charakter zasadowy azotu w pierścieniu, więc trudniej jest utworzyć wiązanie wodorowe, co wpływa na gorszą stabilizację stanu wzbudzonego względem stanu podstawowego. To skutkuje przesunięciem batochromowym pasm w alkoholach [4].

3.3.4 Oszacowanie zmian momentu dipolowego za pomocą równania Lipperta – Matagi

W celu dokładniejszego wyjaśnienia tak dużego przesunięcia Stokesa zastosowano równanie Lipperta – Matagi [78][79]. Opiera się ono na wykorzystaniu wartości przesunięć Stokesa i polarności rozpuszczalników w celu oszacowania różnicy w momentach dipolowych stanu podstawowego i stanu wzbudzonego ($\Delta\mu = \mu_e - \mu_g$). Metoda ta jest powszechnie stosowana w badaniach właściwości fotofizycznych związków push – pull do charakterystyki procesu przeniesienia ładunku [80][81].

Równanie występuje w formie:

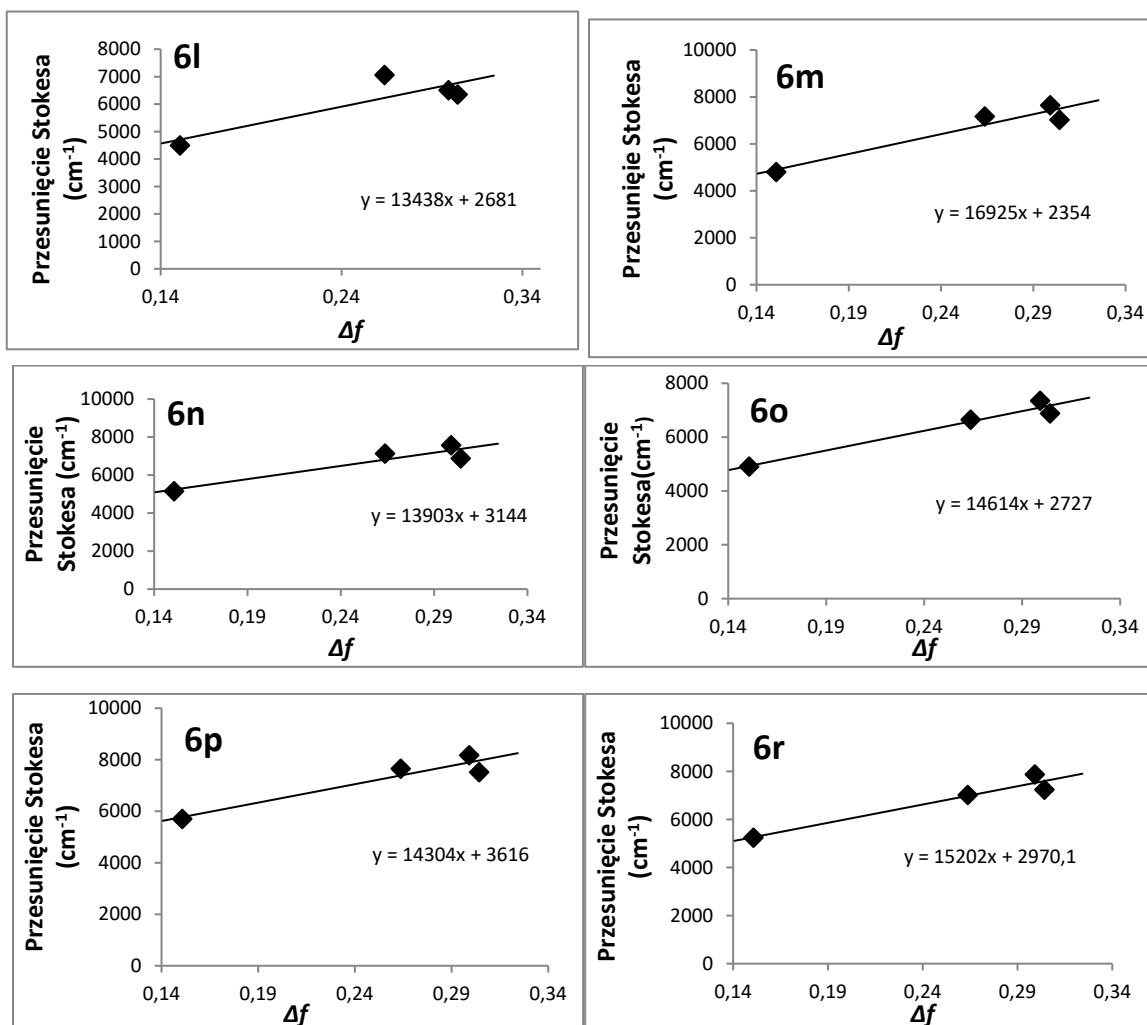
$$\Delta\nu = \Delta E_{exc-em} = \frac{2(\mu_e - \mu_g)^2}{hca^3} \Delta f + Const. \quad (1)$$

$$\Delta f = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (2)$$

gdzie, $\Delta\nu$ - przesunięcie Stokesa w danym rozpuszczalniku (cm^{-1}), h - stała Plancka, c – prędkość światła w próżni, a – promień wnęki Onsagera. Wartości promienia wnęki Onsagera i momentów dipolowych w stanie podstawowym uzyskano w wyniku obliczeń teoretycznych (Gaussian09, DFT/B3LYP/6-311+G(d)) [82]. Δf prezentuje polaryzowalność orientacyjną (dipolową) rozpuszczalnika, która określa ruchliwość ładunków i moment dipolowy cząsteczki rozpuszczalnika. Wartość Δf została obliczona za pomocą równania (2) gdzie ε jest stałą dielektryczną rozpuszczalnika, a n jest współczynnikiem załamania światła rozpuszczalnika. Rysunek 29 przedstawia wykresy Lipperta-Matagi, które dostarczają danych do dalszych obliczeń. Z nachylenia prostych oblicza się różnicę $\Delta\mu_e$ ($Slope = \frac{2}{hca^3} (\Delta\mu_{eg})^2$), której wartości przedstawione są w Tabeli 6, razem z danymi uzyskanymi z równania. Obliczone wartości $\Delta\mu_{eg}$ to 16.7 D, 18.4 D, 16.3 D, 17.8 D, 16.1 D and 15.8 D, odpowiednio dla związków 6l-r. Takie duże zmiany w momencie dipolowym sugerują, że przejściu w stan wzbudzony, towarzyszy proces przeniesienia ładunku.

Tabela 6. Tabela zawierająca wartości promienia wnęki Onsagera, współczynniki nachylenia oraz różnice momentów dipolowych w stanie podstawowym i wzbudzonym ($\Delta\mu_{eg}$).

związek	promień wnęki Onsagera (Å)	nachylenie (cm^{-1})	$\Delta\mu_{eg}$ (Debaj)	μ_g (Debaj)	μ_e (Debaj)
6l	5,93	13438 ± 5578	16,7	5,6	22,3
6m	5,86	16925± 3660	18,4	3,8	22,2
6n	5,77	13903± 3722	16,3	3,1	19,4
6o	6,01	14614± 2235	17,8	2,3	20,1
6p	5,66	14304± 3404	16,1	3,2	19,3
6r	5,50	15202± 2888	15,8	3,5	19,3



Rysunek 29. Wykresy przedstawiające przesunięcia Stokesa jako funkcję parametru polarności rozpuszczalnika Δf (ϵ , n^2).

3.3.5 Obliczenia teoretyczne

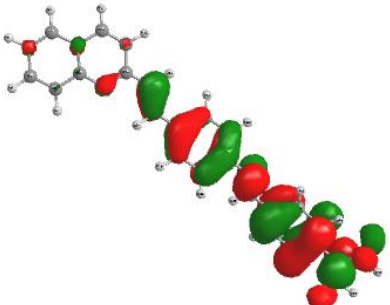
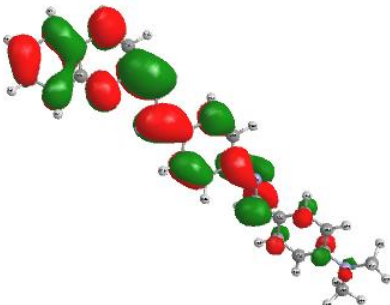
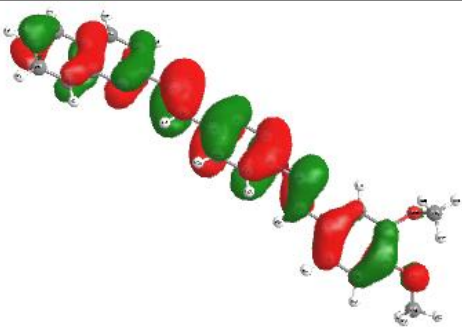
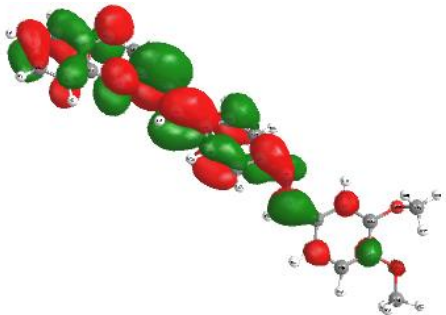
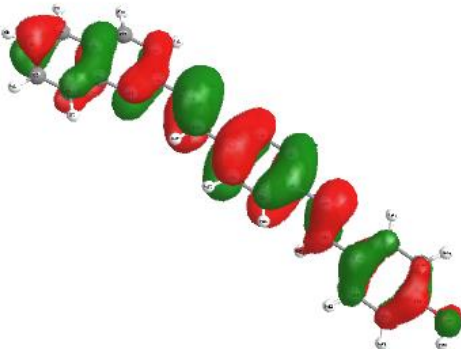
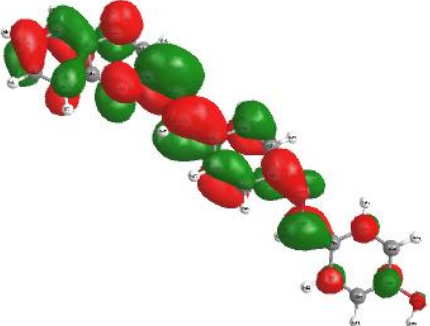
W celu uzupełnienia wiedzy uzyskanej z pomiarów spektroskopowych wykonano obliczenia teoretyczne z wykorzystaniem teorii funkcjonału gęstości DFT. W wyniku tego uzyskano charakterystykę przejść elektronowych odpowiedzialnych za maksima widm absorpcyjnych oraz emisyjnych, jak i ustalono orbitale zaangażowane w proces wzbudzenia. Dodatkowo obliczenia ujawniły zmiany strukturalne zachodzące w cząsteczce w stanie wzbudzonym. Wyniki przeprowadzonych obliczeń zamieszczone są w Tabelach 7, 8 oraz 9 poniżej. Rysunek 30 przedstawia natomiast wizualizacje orbitali granicznych zaangażowanych w główne przejścia elektronowe.

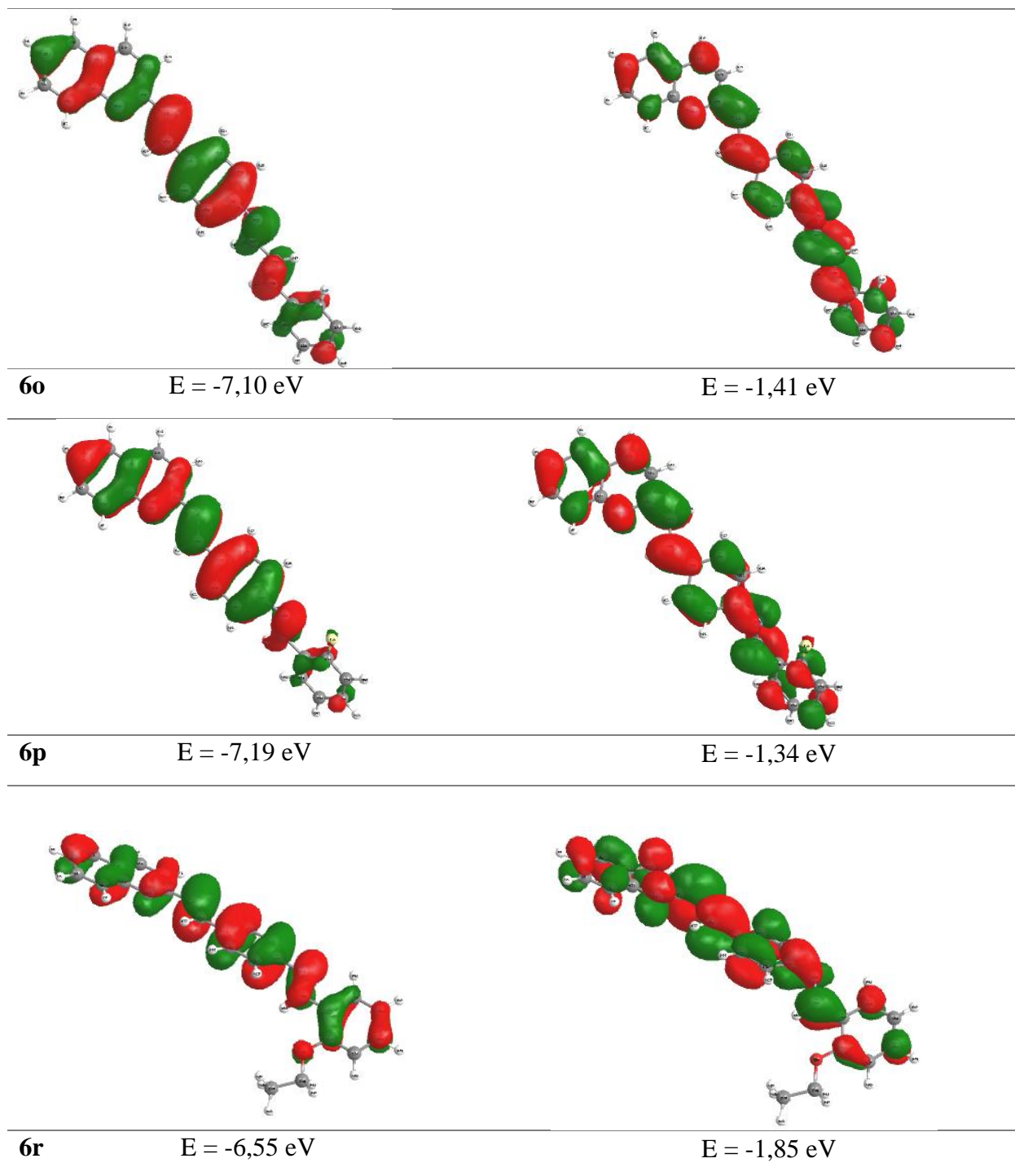
Tabela 7. Obliczenia dotyczące przejść elektronowych otrzymane za pomocą metody funkcjonału gęstości TD-DFT//CAM-B3LYP//6-311+G(d,p) z wykorzystaniem modelu PCM (rozpuszczalnik – etanol) oraz zoptymalizowanej struktury związku za pomocą metody DFT.

związek	przejście elektronowe	λ (nm)	f	orbitale molekularne	udział procentowy (%)	wartości eksperymentalne λ (nm)
6l	$S_0 \rightarrow S_1$	367	2,2134	HOMO \rightarrow LUMO	57	388
	$S_0 \rightarrow S_6$	274	0,0800	HOMO ₋₁ \rightarrow LUMO ₊₄	55	282
6m	$S_0 \rightarrow S_1$	356	1,8851	HOMO \rightarrow LUMO	86	368
	$S_0 \rightarrow S_5$	271	0,2781	HOMO ₋₁ \rightarrow LUMO HOMO ₋₁ \rightarrow LUMO ₊₁	23 18	276
6n	$S_0 \rightarrow S_1$	355	1,8087	HOMO \rightarrow LUMO	88	370
	$S_0 \rightarrow S_5$	267	0,3937	HOMO ₋₁ \rightarrow LUMO HOMO ₋₃ \rightarrow LUMO ₊₁	23 18	272
6o	$S_0 \rightarrow S_1$	364	2,1305	HOMO \rightarrow LUMO	85	372
	$S_0 \rightarrow S_5$	280	0,2265	HOMO ₋₂ \rightarrow LUMO HOMO ₋₆ \rightarrow LUMO	15 14	274
6p	$S_0 \rightarrow S_2$	354	1,6569	HOMO \rightarrow LUMO	88	362
	$S_0 \rightarrow S_5$	265	0,4493	HOMO \rightarrow LUMO ₊₂ HOMO ₋₁ \rightarrow LUMO	21 12	270
6r	$S_0 \rightarrow S_1$	358	1,7470	HOMO \rightarrow LUMO	87	366
	$S_0 \rightarrow S_6$	265	0,2758	HOMO \rightarrow LUMO ₊₂ HOMO \rightarrow LUMO ₊₃	21 11	272

Obliczenia teoretyczne zostały przeprowadzone z zastosowaniem teorii funkcjonału gęstości DFT oraz zależnej od czasu teorii funkcjonału gęstości TD-DFT jako metody obliczeniowej [82], przy użyciu funkcjonału CAM-B3LYP [83] oraz bazy funkcyjnej 6-311+G(d,p). Z uwagi na to, że pomiary zostały przeprowadzone w roztworach, w obliczeniach dodatkowo zastosowano model PCM, aby uwzględnić oddziaływania cząsteczek z rozpuszczalnikiem [84][85]. Każde przejście elektronowe scharakteryzowane jest za pomocą parametrów takich jak siła oscylatora (f), energia (λ/nm) oraz udział poszczególnych orbitali zaangażowanych w proces wzbudzenia. Obliczono 50 przejść elektronowych dla każdej cząsteczki, lecz w tabeli pominięto te o niskiej sile oscylatora, gdyż stanowią tylko tło dla widm absorpcji i nie wnoszą istotnych informacji. Uzyskane wartości prezentują zadowalającą zgodność w porównaniu do danych eksperymentalnych. Wizualizacja orbitali zaangażowanych w przejścia elektronowe pozwala natomiast na analizę zmian w rozkładzie ładunku zachodzących w molekułach (Rysunek 30). Zgodnie z otrzymanymi danymi teoretycznymi, za maksimum pierwszego pasma w widmie absorpcji odpowiedzialne jest przejście $S_0 \rightarrow S_1$ w przypadku każdego związku. Przejście to angażuje orbitale graniczne HOMO i LUMO, a ich kształt wskazuje na przejścia typu $\pi \rightarrow \pi^*$. W przypadku związku 6l, gęstość elektronowa najniższego zajętego orbitalu ulokowana jest przede wszystkim na pierścieniu fenylowym posiadającym grupy $-N(CH_3)_2$ oraz pierścieniu połączonym z nim za pomocą wiązania iminowego. Orbital LUMO natomiast obejmuje strukturę chinoliny. Widoczne jest więc wyraźne przeniesienie ładunku z części elektronodonorowej do części elektronoakceptorowej. Podobną właściwość można zaobserwować także analizując wyniki dla związków 6m, 6n oraz 6r mimo że transfer ładunku nie jest już tak bardzo widoczny jak w przypadku związku 6l. Orbital HOMO obejmuje praktycznie całą cząsteczkę. W przypadku LUMO natomiast, można zauważyć przesunięcie gęstości elektronowej na lewo w stronę pierścienia chinolinowego. Związek 6o nie posiada żadnych podstawników, które mogłyby sugerować kierunek transferu ładunku. Można go jednak opisać razem ze związkiem 6p, gdyż w obu przypadkach obserwuje się zgoła odwrotną tendencję – dopatrzeć się tu można przesunięcia ładunku w stronę pierścienia fenylowego, a szczególne zagęszczenie widoczne jest w obszarze wiązania iminowego. Do drugiego pasma absorpcyjnego przypisane są przejścia $S_0 \rightarrow S_5$ (dla związku 6m, 6n, 6o, 6p) lub przejścia $S_0 \rightarrow S_6$ (dla związku 6l, 6r), które angażują orbitale HOMO o niższej energii (takie jak HOMO-1, HOMO-3 i HOMO-6) oraz orbitale LUMO o wyższej energii (takie jak LUMO+1, LUMO+2, LUMO+3 i LUMO+4). Dodatkowo, wykonano obliczenia umożliwiające stworzenie map potencjałów elektrostatycznych poszczególnych związków, które pozwalają dokładniej

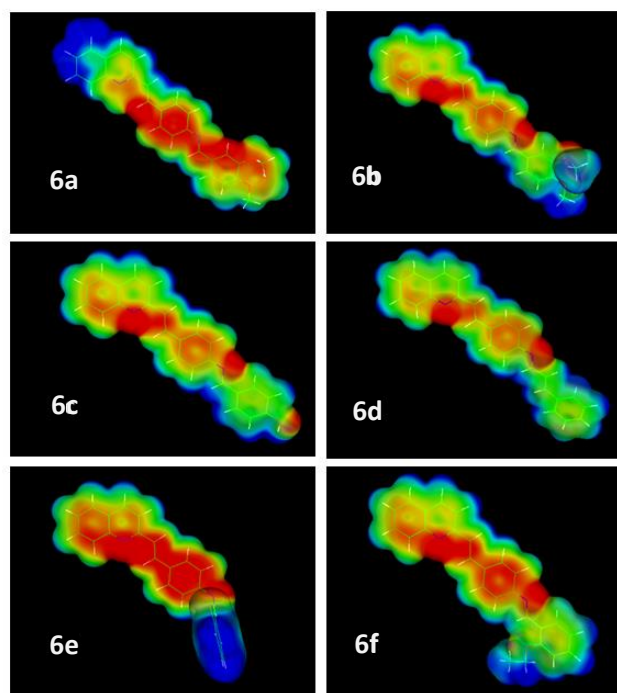
zobaczyć rozkład ładunku w stanie podstawowym, a przez to określić prawdopodobny kierunek migracji chmury elektronowej.

	HOMO	LUMO
		
6l	E = -6,68 eV	E = -1,24 eV
		
6m	E = -7,09 eV	E = -1,29 eV
		
6n	E = -7,10 eV	E = -1,28 eV



Rysunek 30. Wizualizacja orbitali granicznych HOMO i LUMO zaangażowanych w proces wzbudzenia.

Otrzymane mapy potencjałów zaprezentowane są na Rysunku 31. Czerwony kolor wskazuje obszary o najbardziej ujemnym potencjale, natomiast kolor niebieski oznacza najbardziej dodatni potencjał. Największą spójność otrzymanych danych można zauważyć w przypadku związku 6l, który w pierścieniu fenylowym posiada silną elektrodonorową grupę $-C(NH_3)_2$. Obszar ten na mapie potencjału elektrostatycznego jest pomarańczowy, co świadczy o dużym zagęszczeniu ładunku elektrostatycznego i potwierdza założenie, że ta część stanowi jednostkę donorową w procesie wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia ładunku. Odwrotna sytuacja ma miejsce w przypadku związku 6p, gdzie do skrajnego pierścienia fenylowego przyłączony jest atom fluoru, który jest podstawnikiem elektronoakceptorowym i zmienia rozkład sił w cząsteczce. W tej sytuacji najbardziej ujemny potencjał znajduje się na środkowym pierścieniu fenylowym oraz pierścieniu chinolinowym, co sugeruje przeciwny kierunek przeniesienia ładunku, zgodnie z oczekiwaniami. Biorąc pod uwagę związki 6m, 6n oraz 6r, które w swojej strukturze także posiadają grupy elektronodonorowe, jasno widać, że ten obszar nie jest tak bogaty w elektrony, jak można oczekiwać z uwagi jedynie na charakter podstawnika.



Rysunek 31. Mapy potencjałów elektrostatycznych związków 6l-r przedstawiające rozkład ładunku w stanie podstawowym.

W wyniku optymalizacji singletowych stanów wzbudzonych S_1 , uzyskano także teoretyczne wartości energii pasm emisyjnych. Otrzymane dane w zadowalający sposób odzwierciedlają dane eksperymentalne. Niestety dla związku 6p nie udało się uzyskać satysfakcjonującego wyniku.

Tabela 8. Obliczenia dotyczące optymalizacji singletowych stanów wzbudzonych S_1 otrzymane za pomocą metody funkcyjna gęstości TD-DFT//CAM-B3LYP//6-311+G(d,p) z wykorzystaniem modelu PCM (rozpuszczalnik – etanol).

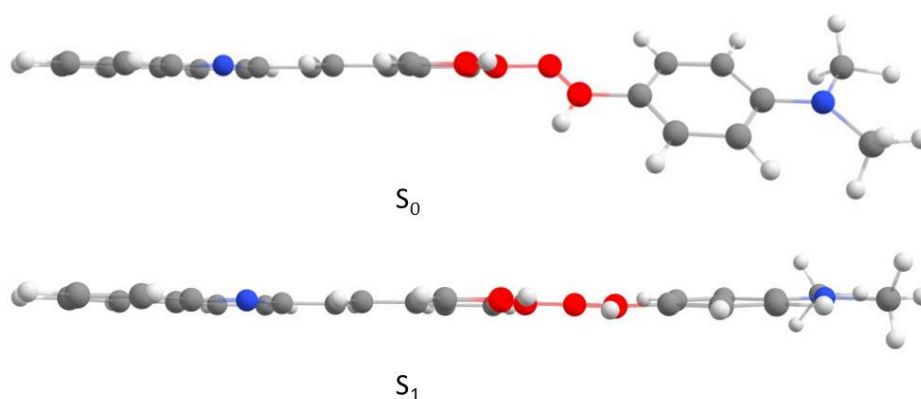
związek	przejście elektronowe	λ (nm)	f	orbitale molekularne	udział procentowy (%)	wartości eksperymentalne λ (nm)
6l	$S_0 \rightarrow S_1$	532	2,5873	HOMO \rightarrow LUMO	91	519
6m	$S_0 \rightarrow S_1$	502	2,2812	HOMO \rightarrow LUMO	93	512
6n	$S_0 \rightarrow S_1$	501	2,2154	HOMO \rightarrow LUMO	93	514
6o	$S_0 \rightarrow S_1$	540	2,4128	HOMO \rightarrow LUMO	91	512
6p	$S_0 \rightarrow S_1$	-	-	-	-	514
6r	$S_0 \rightarrow S_1$	522	1,9072	HOMO \rightarrow LUMO	91	514

Zaobserwowano także różnice strukturalne związku w stanie podstawowym i wzbudzonym, co również może być powodem tak dużych przesunięć Stokesa. Otóż, w stanie wzbudzonym następuje znacząca relaksacja geometrii, która w tym przypadku polega na zmniejszeniu kąta między płaszczyznami styrylochinoliny oraz pierścienia fenyłowego (ok. 30°). Innymi słowy, w stanie wzbudzonym cała cząsteczka staje się bardziej planarna.

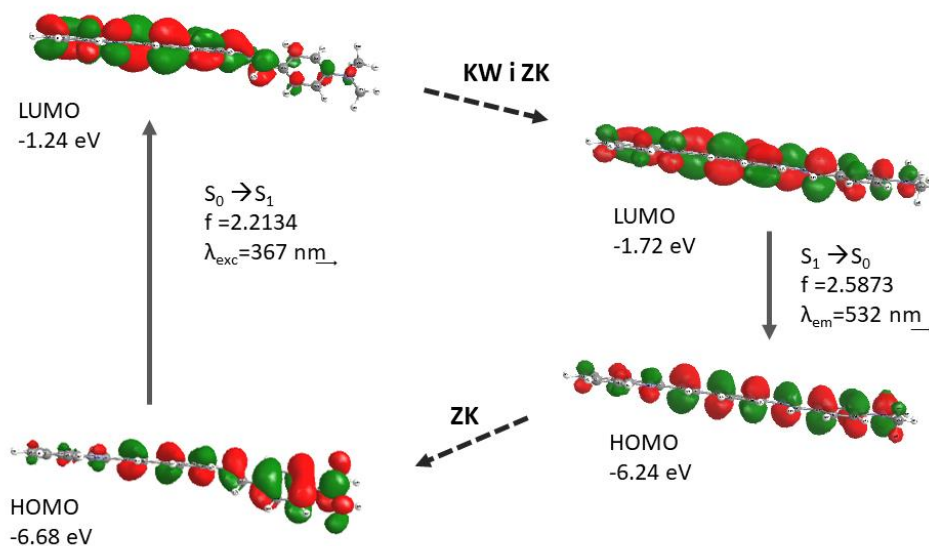
Tabela 9. Porównanie geometrii związków 6l – 6r w stanie podstawowym i w stanie wzbudzonym.

Związek	wartość kąta dwuściennego (C38-N28-C27-C24)/ [°]		
	stan podstawowy S_0	stan wzbudzony S_1	Różnica
6l	42,5	4,5	38,0
6m	42,5	15,9	26,6
6n	42,9	17,0	25,9
6o	41,7	13,3	28,4
6p	-	--	-
6r	42,7	16,0	26,7

W wyniku zmiany geometrii zmniejsza się różnica energii między orbitalami HOMO i LUMO, a energia emisji jest znacznie mniejsza niż energia ekscytacji, czego skutkiem jest zwiększona wartość przesunięcia Stokesa (Rysunek 33) [86]. Zależności te są w zgodzie z diagramem Jabłońskiego (Rysunek 1). Zmiany wartości kątów dwuściennych przedstawione są w Tabeli 9 oraz zilustrowane na Rysunku 32.



Rysunek 32. Geometria związku 6l w stanie podstawowym S_0 oraz w stanie wzbudzonym S_1 uzyskana za pomocą metody TD-DFT//CAM-B3LYP//6-311+G(d,p). Atomy C38-N28-C27-C24 tworzące porównywany kąt dwuścienny oznaczone są kolorem czerwonym.



Rysunek 33. Rysunek przedstawiający relaksację geometrii związku 6l po fotowzbudzeniu. Bardziej planarne ułożenie struktury powoduje zmniejszenie przerwy energetycznej między orbitalami HOMO i LUMO stanu wzbudzonego S_1 . KW oznacza konwersję wewnętrzną, natomiast ZK oznacza zmianę konformacji.

3.3.6 Wpływ wody na właściwości spektroskopowe badanych związków

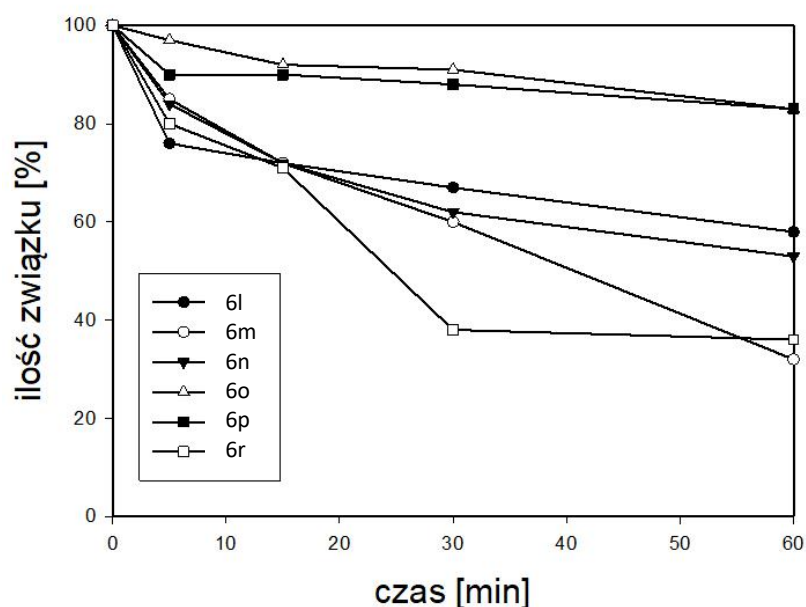
Biorąc pod uwagę fakt, że woda jest podstawowym środowiskiem dla struktur biologicznych, postanowiono dodatkowo zbadać jej wpływ na właściwości spektroskopowe otrzymanych barwników. W tym celu, przeprowadzono serię pomiarów w etanolu, zwiększając za każdym razem ilość wody w mieszaninie. Wyniki z opisanego eksperymentu są przedstawione w Tabeli 10.

Tabela 10. Własności spektroskopowe związków w zależności od ilości wody w mieszaninie; S – przesunięcie Stokesa

związek	Etanol			etanol + woda (80%/20%)			etanol + woda (50%/50%)			etanol + woda (40%/60%)		
	λ_{abs} nm	λ_{em} nm	S nm/cm ⁻¹	λ_{abs} nm	λ_{em} nm	S nm/cm ⁻¹	λ_{abs} nm	λ_{em} nm	S nm/cm ⁻¹	λ_{abs} nm	λ_{em} nm	S nm/cm ⁻¹
6l	388	519	131/6505	388	527	139/6797	388	534	146/7046	354	540	186/9730
6m	368	512	144/7642	368	524	156/8090	368	530	162/8305	366	534	168/8595
6n	366	514	146/7867	366	524	158/8238	366	530	164/8454	366	534	168/8595
6o	372	512	140/7350	372	524	152/7797	372	532	160/8084	366	536	170/8665
6p	362	514	152/8169	360	525	165/8730	362	529	167/8720	360	533	173/9016
6r	366	514	148/7867	366	522	156/8165	366	530	164/8454	362	534	172/8897

Po przeanalizowaniu uzyskanych wyników nie zauważono praktycznie żadnych zmian w widmach absorpcji. Wyjątkiem jest widmo związku 6l, gdzie maksimum pasma jest silnie przesunięte w stronę fal krótszych w roztworze zawierającym 60% wody. Widma fluorescencji natomiast, zmieniają się znacznie wraz ze wzrostem ilości wody w mieszaninie. Przede wszystkim widoczne jest znaczne przesunięcie batochromowe. Ponadto, w większości przypadków wzrasta intensywność fluorescencji. Widma pokazujące te zależności przedstawione są na Rysunku 29. Zaobserwowane zależności pokrywają się z właściwościami wynikającymi z występowania zjawiska solwatochromizmu oraz procesu przeniesienia ładunku – dodatkowa ilość wody powoduje wzrost polarności środowiska. Jednakże, biorąc pod uwagę naturę wiązania iminowego i jego trwałość, a także ostatnie doniesienia naukowe [87], postanowiono dokładniej zgłębić ten temat. Jedną z możliwych przyczyn zachodzących zmian w środowisku wodnym może być rozkład związku. Dlatego też, skupiono uwagę na zbadaniu procesu hydrolizy z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii ciekowej HPLC (z ang. *high – performance liquid chromatography*) W tym celu przygotowano próbki badanych związków zawierające 25% objętościowych wody oraz 75%

objętościowych metanolu i wykonano pomiar widma po 5, 15, 30 i 60 minutach. Badanie to potwierdziło przypuszczenia o hydrolizie otrzymanych barwników. Rysunek 34 przedstawia wykresy ukazujące tempo rozkładu poszczególnego związku.



Rysunek 34. Wykres przedstawiający tempo rozkładu poszczególnych związków 6l-r w obecność wody.

W przypadku związków 6m i 6r obserwujemy relatywnie szybki rozkład, gdzie po jednej godzinie ilość produktu spada do 30 – 40% początkowej wartości. Natomiast związki 6o i 6p w obecności wody, tracą zaledwie około 15% składu. W związku z tym, że jeden z substratów (4-amino)-2-styrylo-chinolina (SC2) także jest fluoroforem, istnieje możliwość że sygnał fluorescencyjny obserwowany w komórkach nie pochodzi od oryginalnie zaaplikowanego barwnika a od jego mieszaniny z substratem, szczególnie w przypadku związków 6m i 6r. Widma absorpcji i emisji (4-amino)-2-styrylo-chinoliny znajdują się bowiem w podobnym zakresie UV-VIS. Intensywność fluorescencji SC2 ulega jednak znacznemu osłabieniu w środowisku wodnym.

3.3.7 Aktywność biologiczna i wybarwianie komórkowe

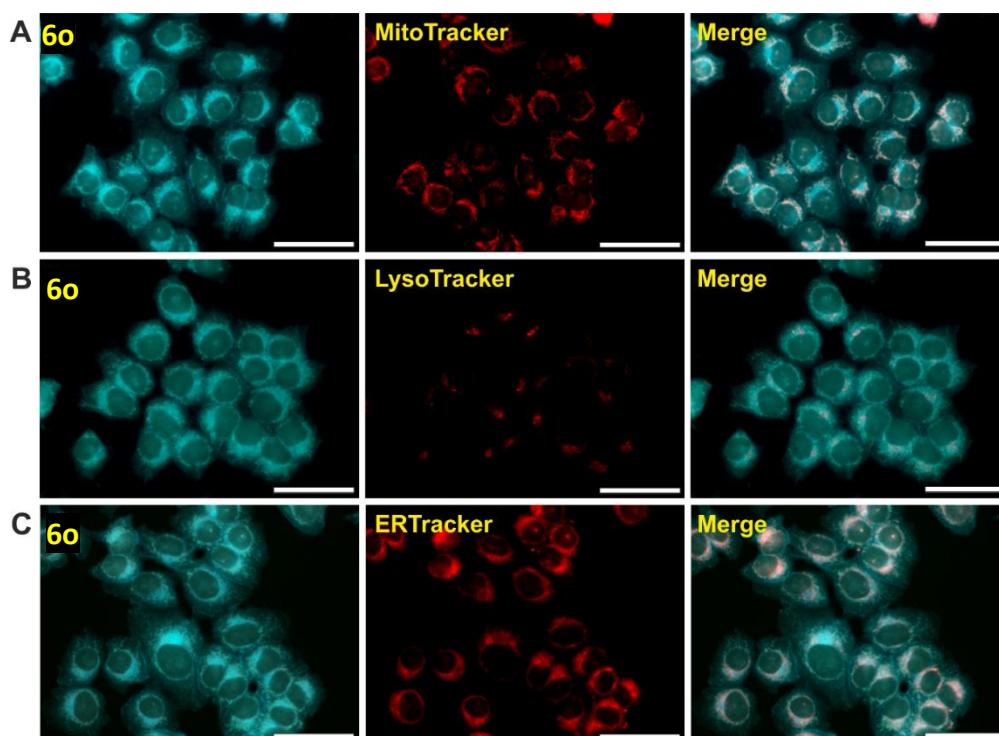
Ostatnim punktem analizy, koniecznym do przeprowadzenia przed właściwym zastosowaniem otrzymanych związków było określenie ich cytotoksyczności. Od barwników komórkowych oczekuje się braku aktywności biologicznej, która mogłaby zakłócać proces barwienia oraz prowadzić do rozbieżności wyników. Dzięki współpracy z dr Katarzyną Malarz przeprowadzono eksperyment z użyciem linii komórkowej HCT116 nowotworu jelita grubego oraz komórek prawidłowych linii NHDF ludzkich fibroblastów, w wyniku którego stwierdzono brak cytotoksyczności do stężenia związku na poziomie 25 μM (Tabela 11).

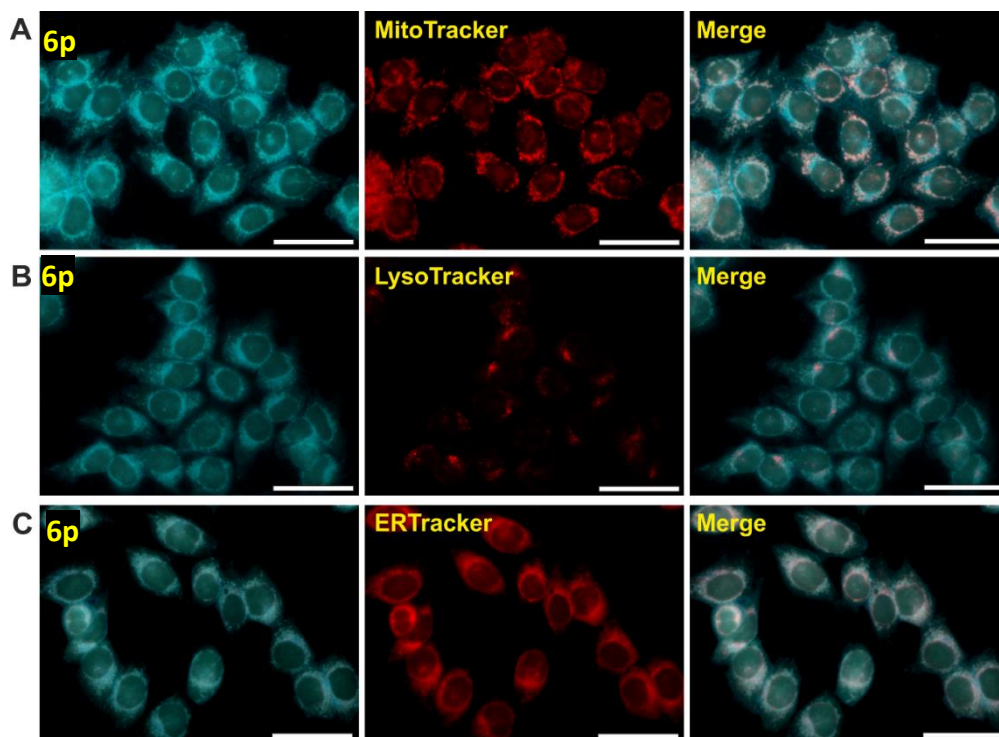
Tabela 11. Aktywność antyproliferacyjna związków 6l – 6r względem linii komórkowej HCT 116 nowotworu jelita grubego oraz komórek prawidłowych linii NHDF ludzkich fibroblastów.

związek	IC ₅₀ [μM]	
	HCT 116	NHDF
6l	>25	>25
6m	>25	>25
6n	>25	>25
6o	>25	>25
6p	>25	>25
6r	>25	>25

Właściwości spektroskopowe badanych fluoroforów - duże przesunięcie Stokesa, wartości długości fal ekscytacji i emisji oraz wystarczająca wydajność kwantowa, a przy tym brak aktywności biologicznej - pozwalają na zastosowanie ich jako barwników do obrazowania komórkowego. Mając na uwadze jednak możliwość rozkładu związku w środowisku wodnym, do eksperymentu wybarwiania wybrano tylko związki 6o oraz 6p, a warunki eksperymentu dobrano w sposób zapewniający najkrótszy możliwy czas inkubacji i pomiaru sygnału, co zapewnia odpowiednie stężenie wprowadzonego barwnika. Ustalono także miejsce kumulacji sensorów w komórkach. W tym celu użyto komercyjnych barwników komórkowych specyficznych dla poszczególnych organelli takich jak: mitochondria (MitoTracker Orange), lizosomy (LysoTracker® Red DND-99) oraz siateczka śródplazmatyczna (ER-Tracker™ Red BODIPY® TR Glibenclamide). Na podstawie uzyskanych zdjęć (Rysunek 35) stwierdzono, że związki te mają tendencję do gromadzenia się w strukturach błoniastych komórki oraz związanych z nimi organellach. Przyglądając się jednak dokładniej, można zauważyć pewne

powiązanie między strukturą związku a miejscem kumulacji. Otrzymane iminy są słabymi zasadami, więc czymś naturalnym wydaje się być ich powinowactwo do lizosomów – kwaśnych struktur komórkowych. Jednak, związki 6o i 6p najsilniej gromadzą się w retikulum endoplazmatycznym i mitochondriach, natomiast w lizosomach obserwuje się raczej ich znikome stężenie. Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe, wciąż nie ustalono jednoznacznie co decyduje o wybiórczym kumulowaniu się barwników w ER. Jednakże, związki mające powinowactwo do ER i mitochondriów, w tym związki 6o oraz 6p przedstawione w tej pracy, posiadają kilka wspólnych cech, które być może są kluczowe dla ich zachowania w komórkach. Mianowicie, barwniki te posiadają układy aromatyczne średnich rozmiarów (20 – 30 atomów) oraz umiarkowaną (lub w tym wypadku także dość wysoką) lipofilowość (6o – $\log P=7.1$, 6p – $\log P=5.3$). Dodatkowo, zasady Schiffa mogą być częściowo protonowane w komórce, co zwiększa ich powinowactwo do negatywnie naładowanej błony mitochondrialnej. Kationowy charakter związków jest także cechą charakterystyczną dla wszystkich sond wybarwiających ER [88].





Rysunek 35. Zdjęcia fluorescencyjne komórek linii HCT116 nowotworu jelita grubego inkubowanych ze związkami 6o oraz 6p (25 μ M) w warunkach 37 °C oraz czasie 1h. Zdjęcia przedstawiają kolokalizację badanych związków z komercyjnymi barwnikami fluorescencyjnymi specyficznymi dla danych organelli takich jak lizosomy, mitochondria i siateczka śródplazmatyczna. Białe wskaźniki skali odpowiadają 50 μ m.

3.4 Związek 6s jako wielozadaniowy chemosensor

3.4.1 6s jako pro – barwnik

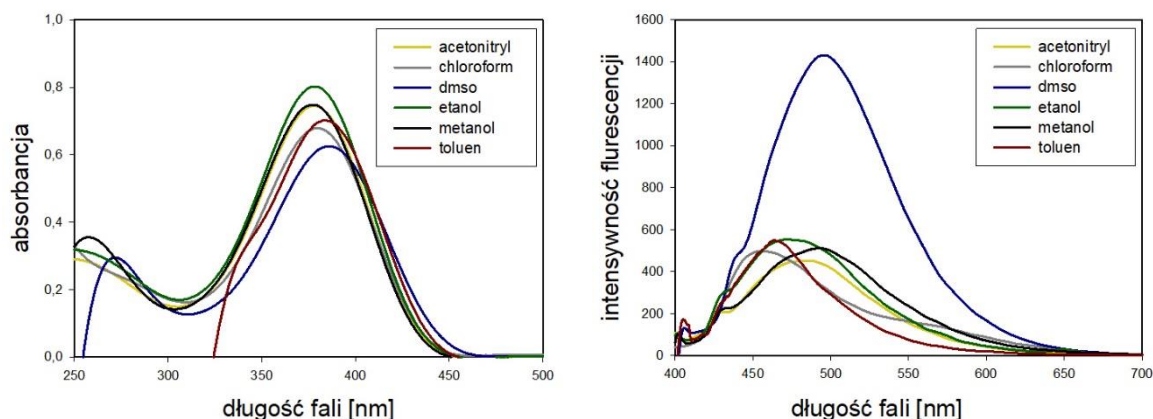
Wśród nowo zsyntezowanych barwników na szczególną uwagę zasługuje związek 6s, dlatego zostanie on opisany osobno. Analiza tego związku obejmuje wszystkie wcześniej opisane badania, a ponadto wzbogacona jest o kilka dodatkowych testów ze względu na szczególne jego właściwości.

3.4.1.1 Charakterystyka własności spektroskopowych związku 6s

Analogicznie do poprzednich badań, zarówno widma absorpcji jak i emisji zostały zmierzone w różnych rozpuszczalnikach tj. toluenie, chloroformie, acetonitrylu, metanolu, etanolu oraz DMSO. Otrzymane wyniki pomiarów przedstawione są w tabeli poniżej (Tabela 12), a widma absorpcji i emisji zaprezentowane na Rysunku 36.

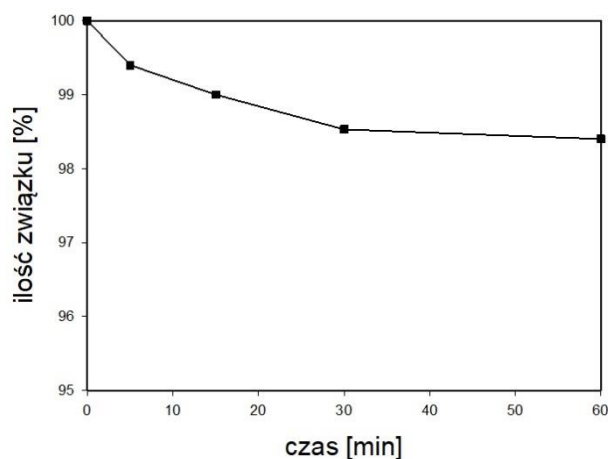
Tabela 12. Tabela przedstawiająca charakterystykę spektralną nowo zsyntezowanego związku 6s. Pomiarów dokonano w etanolu, przy stężeniu badanej próbki $1,25 \times 10^{-5}$ mol/dm³ w przypadku absorpcji oraz $6,2 \times 10^{-6}$ mol/dm³ w przypadku emisji.

6s			
rozpuszczalnik	absorpcja [nm]	emisja [nm]	przesunięcie Stokesa [nm/cm-1]
toluen	385	460	75/4235
chloroform	380	465	80/4576
acetonitryl	378	470	92/5178
metanol	378	492	114/6130
etanol	380	478	98/5395
DMSO	386	495	109/5705
EtOH/woda +HCl	rozkład związku		



Rysunek 36. Widma absorpcyjne oraz emisyjne związku 6s w różnych rozpuszczalnikach.

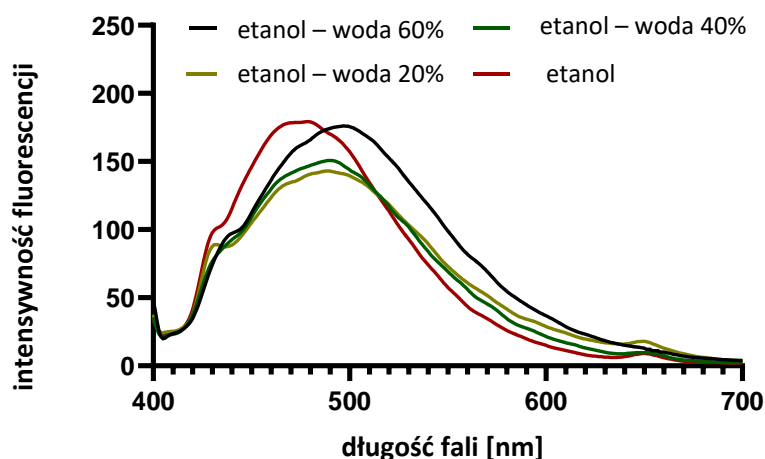
Maksima widm absorpcji oscylują w zakresie 378 – 386 nm i nie wykazują szczególnej zależności od polarności rozpuszczalnika. Widma emisji natomiast pokrywają zakres 460 – 495 nm, co odpowiada fluorescencji światła niebieskiego i niebiesko – zielonego. Podobnie, jak w przypadku wyżej opisanych związków, 6s również przejawia pozytywny solwatochromizm. Dodatkowo, wykonano test z wykorzystaniem metody HPLC, mający na celu ustalenie stopnia rozkładu związku w środowisku wodnym. Wyniki tego badania przedstawione są na rysunku poniżej.



Rysunek 37. Wykres przedstawiający tempo rozkładu związku 6s w obecności wody.

Łatwo zauważyć, że związek nie wykazuje żadnych znacznych zmian w czasie, w obecności wody, co świadczy o jego stabilności. Prawdopodobnie jest to spowodowane obecnością wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego, które stabilizuje strukturę oraz zabezpiecza wiązanie iminowe. Co więcej, dokonano pomiaru widm emisyjnych związku 6s, w roztworach

etanolu zawierających poszczególne 0%, 20%, 40% oraz 60% wody (Rysunek 38). Uzyskane wyniki potwierdzają występowanie zjawiska solwatochromizmu, gdyż wraz ze wzrostem zawartości wody, a tym samym wraz ze wzrostem polarności roztworu, następuje bathochromowe przesunięcie maksimum pasma.

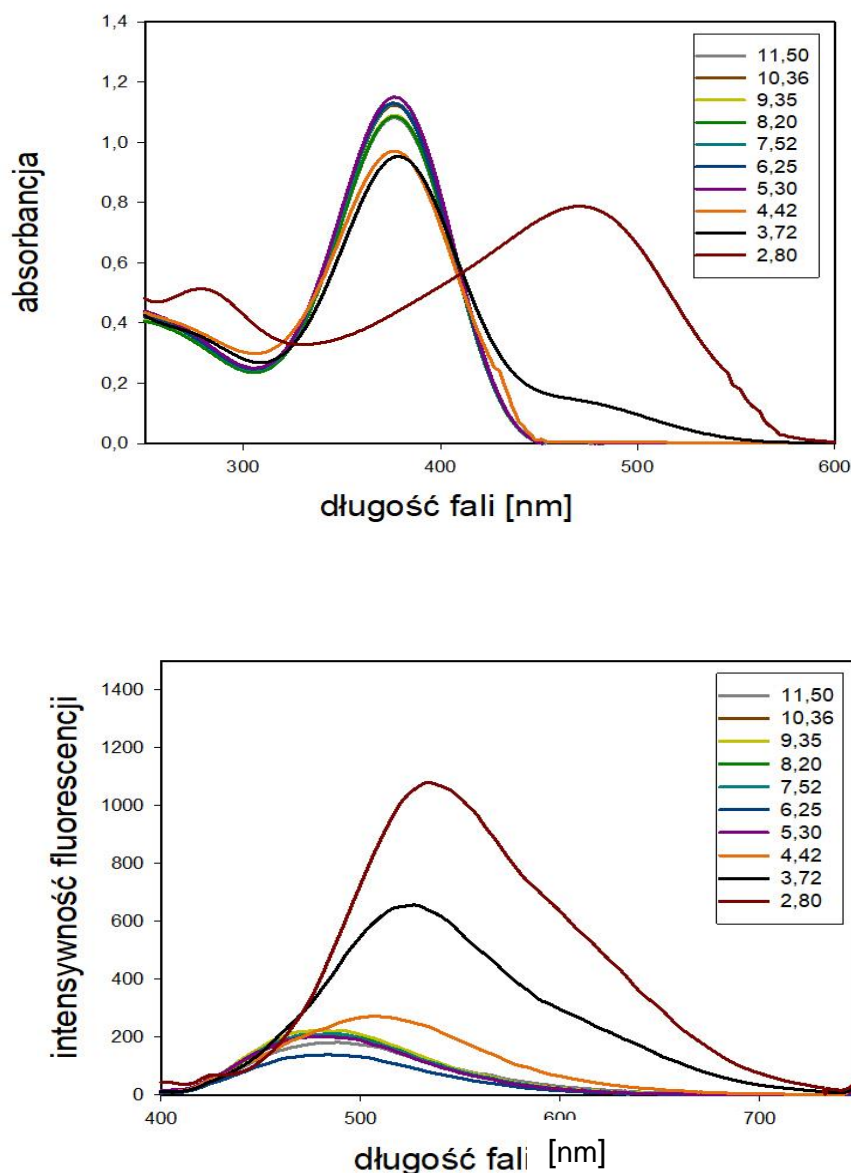


Rysunek 38. Widma emisyjne związku 6s w roztworach posiadających różną zawartość wody.

Tabela 13. Własności spektroskopowe związku 6s w zależności od pH roztworu.

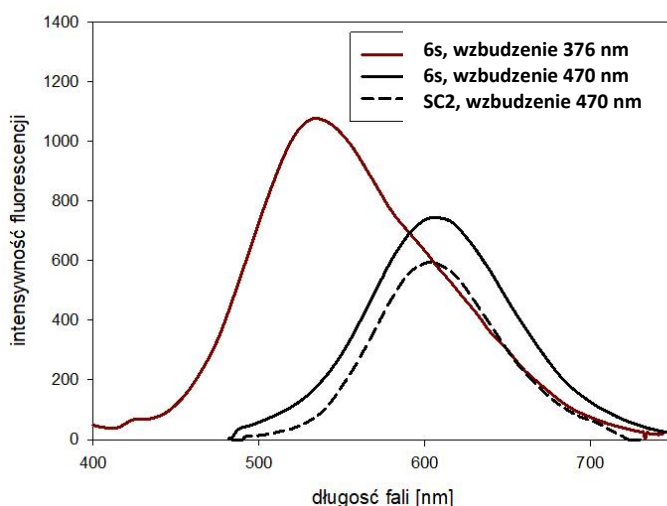
pH	absorpcja [nm]	emisja [nm]
2,80	470	536
3,72	376/470	527
4,42	376	512
5,30	376	488
6,25	376	488
7,52	376	488
8,20	376	488
9,35	376	488
10,36	376	488
11,50	376	488

Po potwierdzeniu stabilności związku w środowisku wodnym, postanowiono zbadać zależność jego właściwości fluorescencyjnych od pH środowiska. W tym celu przeprowadzono szereg pomiarów w mieszaninie woda (20%) /etanol (80%), regulując warunki kwasowo – zasadowe za pomocą rozcieńczonych roztworów kwasu solnego HCl oraz zasady sodowej NaOH, każdorazowo mierząc pH roztworu. Wyniki tych pomiarów przedstawione są w Tabeli 13 oraz na widmach zaprezentowanych na Rysunku 39.



Rysunek 39. Widma absorpcyjne oraz emisyjne związku 6s w roztworach o różnym pH.

Po analizie uzyskanych danych ustalono, że barwnik wykazuje relatywnie stabilną fluorescencję w zakresie pH 12 – 5. Świadczy o tym zbliżona intensywność emisji oraz maksima widm oscylujące wokół tej samej wartości ~ 490 nm. Poniżej pH=5 zaobserwowano postępujące przesunięcie batochromowe (do długości fali 550 nm) oraz około 5 – krotny wzrost intensywności fluorescencji. W przypadku widm absorpcji, sytuacja wyglądała podobnie – w zakresie pH 12 – 5 nie zaobserwowano żadnych zmian. Natomiast, w bardziej kwaśnym środowisku pojawiło się nowe, znacznie przesunięte w stronę fal dłuższych pasmo, o maksimum przy 470 nm. Warto zaznaczyć, że widma fluorescencji wykonane w tym eksperymencie wzbudzone były przy tej samej długości fali - 376 nm. W obliczu zmian zachodzących w niskich zakresach pH, wykonano dodatkowy pomiar wzbudzając widmo przy długości 470 nm (Rysunek 40). W ten sposób otrzymano pasmo emisji z maksimum przy 606 nm – co odpowiada zakresowi światła pomarańczowego. Uzyskanie dwóch różnych pasm w zależności od długości fali wzbudzenia wskazuje na obecność dwóch różnych związków w mierzonym roztworze. Dlatego też przyjęto, że najbardziej prawdopodobną przyczyną takiej sytuacji jest rozkład związku w kwaśnym środowisku. O ile hydroliza zasad Schiffa w neutralnym środowisku wodnym jest kwestią trudną do przewidzenia, to powszechnie wiadomo, że niskie pH jest w stanie efektywnie doprowadzić do rozpadu wiązania iminowego [89]. Aby potwierdzić tę teorię, wykonano dodatkowo pomiar widma jednego z substratów (SC2) w zakwaszonym roztworze, którego maksimum nałożyło się z maksimum widma związku 6s (oba widma wzbudzone przy długości 470 nm) (Rysunek 40).



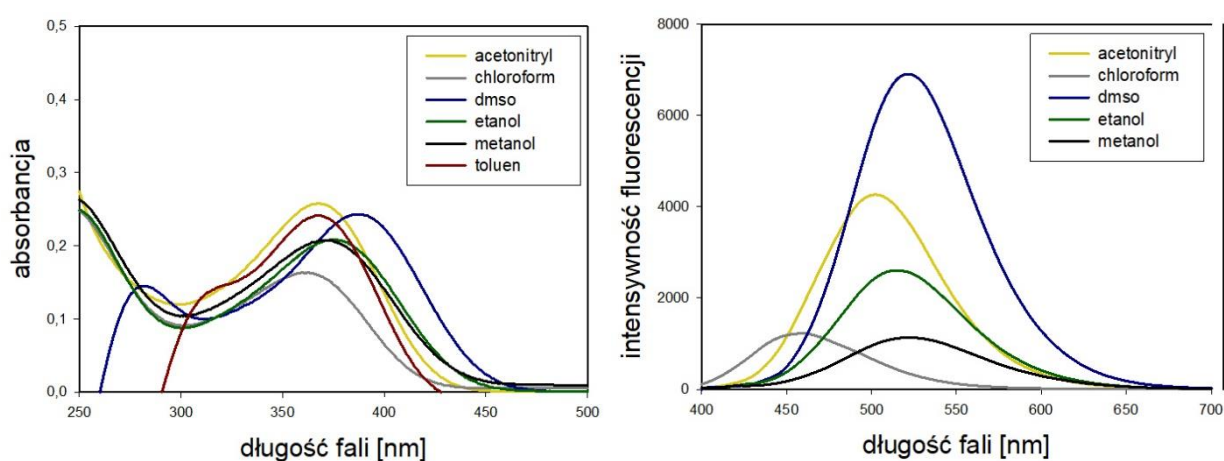
Rysunek 40. Widma emisyjne zakwaszonych roztworów związku 6s (linia ciągła) oraz związku SC2 (linia przerywana) w zależności od długości fali wzbudzenia (czerwona linia – wzbudzenie przy 376 nm, czarna linia – wzbudzenie przy 470 nm).

3.4.1.2 Charakterystyka własności spektroskopowych związku SC2

Związek SC2 (4-aminostyrylochinolina) przejawia bardzo podobne własności spektroskopowe, co związek 6s (Tabela 14). Absorbuje światło w tym samym zakresie, wykazuje pozytywny solwatochromizm, a widma emisji są przesunięte batochromowo o ok. 30 nm w porównaniu do zasady Schiffa – odpowiadają więc emisji światła niebiesko – zielonego i zielonego. Najciekawszą cechą jest jednak widoczna zmiana emisji w środowisku kwaśnym – widmo zostaje znacznie przesunięte w stronę fal dłuższych (606 nm) i tym samym związek emituje światło koloru pomarańczowego.

Tabela 14. Tabela przedstawiająca charakterystykę spektralną związku SC2.

SC2			
rozpuszczalnik	absorpcja [nm]	emisja [nm]	przesunięcie Stokesa [nm/cm ⁻¹]
toluen	368	-	74/4549
chloroform	362	457	95/5742
acetonitryl	368	502	134/7253
metanol	372	522	150/7724
etanol	375	514	139/7211
DMSO	388	522	134/6616
EtOH/woda +HCl	470	606	136/4775

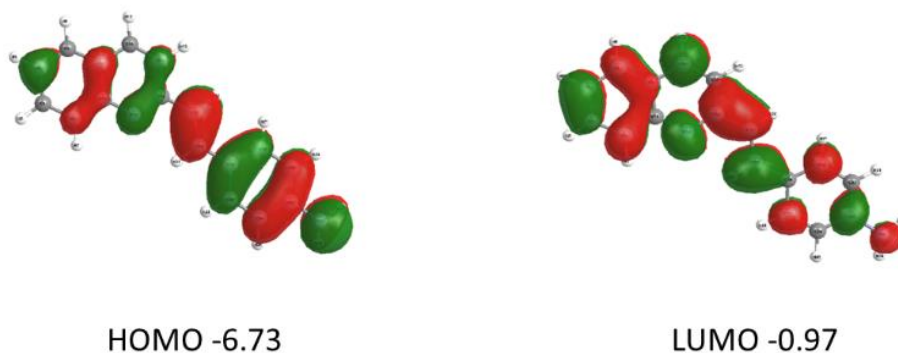


Rysunek 40. Widma absorpcyjne i emisyjne związku SC2 w zależności od polarności rozpuszczalnika

Z uwagi na znaczną zależność pasm emisji od polarności rozpuszczalnika, wykonano dodatkowe obliczenia teoretyczne, aby zwizualizować rozkład ładunku elektronowego w cząsteczce. Do tego zadania wykorzystano zależną od czasu metodę funkcjonału gęstości TD – DFT, gdzie zastosowano bazę funkcyjną 6-311+G(d,p) oraz CAM-B3LYP jako funkcjonał. Wyniki obliczeń, które dotyczą głównych przejść elektronowych odpowiedzialnych za maksima pasm, przedstawione są w Tabeli 15. Podobnie jak w przypadku wyżej przedstawionych zasad Schiffa, każde przejście elektronowe scharakteryzowane jest za pomocą parametrów takich jak siła oscylatora (f), energia (λ /nm) oraz udział poszczególnych orbitali zaangażowanych w proces wzbudzenia. Reszta wyliczonych wzbudzeń została pominięta ze względu na małą wartość siły oscylatora. Obliczone wartości energii przejść (długości fal w maksimum pasma) wykazują zadowalającą zgodność z danymi eksperymentalnymi. Wizualizacja orbitali granicznych (Rysunek 41) zaangażowanych w przejścia elektronowe pozwala określić zmiany w rozkładzie ładunku elektronowego po fotowzbudzeniu. Jak można zauważyć, w tym przypadku orbital HOMO zlokalizowany jest głównie na pierścieniu fenylowym dzięki obecności silnej grupy elektrodonorowej -NH₂. Natomiast, gęstość elektronowa orbital LUMO przesunięta jest w stronę pierścienia chinolinowego, który znany jest jako jednostka akceptorowa.

Tabela 15. Dane dotyczące przejść elektronowych oraz optymalizacji stanu wzbudzonego związku SC2 uzyskane za pomocą metody TD-DFT//CAM-B3LYP//6-311+G (d,p) z wykorzystaniem modelu PCM (roztwór- chloroform).

związek	przejście elektronowe	λ (nm)	F	orbitale molekularne	udział procentowy (%)	dane eksperymentalne λ (nm)
SC2 absorpcja	S ₀ →S ₁	354	1,1780	HOMO→LUMO	90	362
SC2 emisja	S ₀ →S ₁	481	1,5236	HOMO→LUMO	96	457

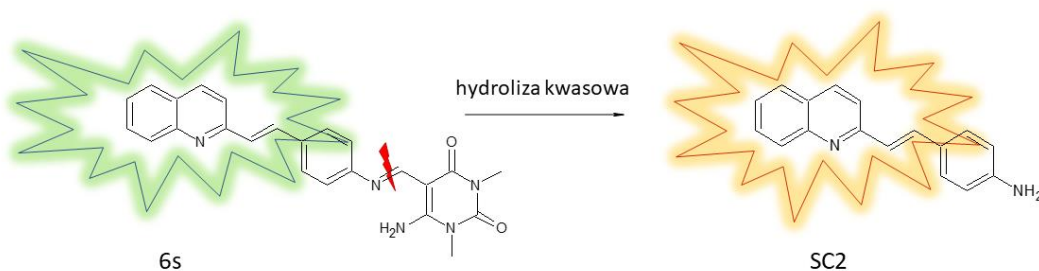


Rysunek 41. Wizualizacja orbitali granicznych HOMO i LUMO cząsteczki SC2 zaangażowanych w proces wzbudzenia.

3.4.1.3 Założenia przyjęte dla związku 6s jako „pro – barwnika”

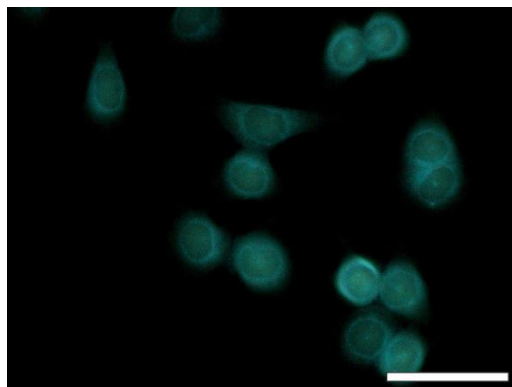
Kluczową sprawą dla organelli biorących udział w szlaku sekrecyjnym oraz endocytotycznym jest utrzymanie odpowiedniego pH, niezbędnego do ich poprawnego funkcjonowania. Jednymi z najbardziej znanych struktur komórkowych zaangażowanych w te mechanizmy są lizosomy. Podczas gdy odczyn cytozolu jest raczej obojętny (6,8 – 7,2), to pH lizosomów waha się od 4 do 5 [90]. Są to optymalne warunki środowiska umożliwiające pracę obecnych tam enzymów katalizujących. Lizosomy odgrywają kluczową rolę w metabolizmie komórki, gdyż dzięki obecności wspomnianych enzymów tzw. hydrolaz, odpowiadają za rozkład białek, kwasów nukleinowych, węglowodanów i tłuszczów. Wymagane kwaśne środowisko zapewnione jest dzięki pracy pompy protonowej H^+ -ATPazy umieszczonej w błonie, która wykorzystuje energię z hydrolizy ATP do transportu protonów do wnętrza lizosomu.

Mając na uwadze jak ważne jest śledzenie prawidłowego pH oraz monitorowanie organelli zaangażowanych w procesy sekrecji i endocytozy, postanowiono wykorzystać fakt rozkładu otrzymanej zasady Schiffa (6s) do selektywnego wybarwiania kwaśnych organelli, a w szczególności lizosomów. Otrzymany związek 6s miałby służyć więc jako nośnik, który po dostaniu się do wnętrza kwaśnych organelli, uwolniłby docelowy barwnik SC2, aktywując w ten sposób fluorescencję światła pomarańczowego (Rysunek 42).



Rysunek 42. Uproszczony schemat przedstawiający zasadę działania związku 6s jako „pro – barwnika”, którego charakterystyczna pomarańczowa fluorescencja aktywowana jest pod wpływem hydrolizy tylko w kwaśnych strukturach komórki.

Rola 6s jako „pro – barwnika” jest o tyle ważna, że eksperyment wybarwiania komórkowego za pomocą SC2 wykazał, że związek ten nie jest w stanie samodzielnie przeniknąć do lizosomów. Na rysunku poniżej przedstawiono zdjęcie, na którym nie widać charakterystycznej pomarańczowej fluorescencji, która powinna zachodzić w warunkach niskiego pH (Rysunek 43). Rezultaty wybarwiania komórek za pomocą związku 6s potwierdziły natomiast przypuszczenie, że związek ten posiada odpowiednią lipofilowość, aby przeniknąć do wnętrza kwaśnych pęcherzyków oraz aktywować proces pożądaną fluorescencji.



Rysunek 43. Zdjęcie fluorescencyjne komórek linii HCT116 nowotworu jelita grubego inkubowanych ze związkiem SC2 w warunkach 37 °C w czasie 2h. Biały wskaźnik skali odpowiada 50 μm.

3.4.1.4 Aktywność biologiczna i wybarwianie komórkowe

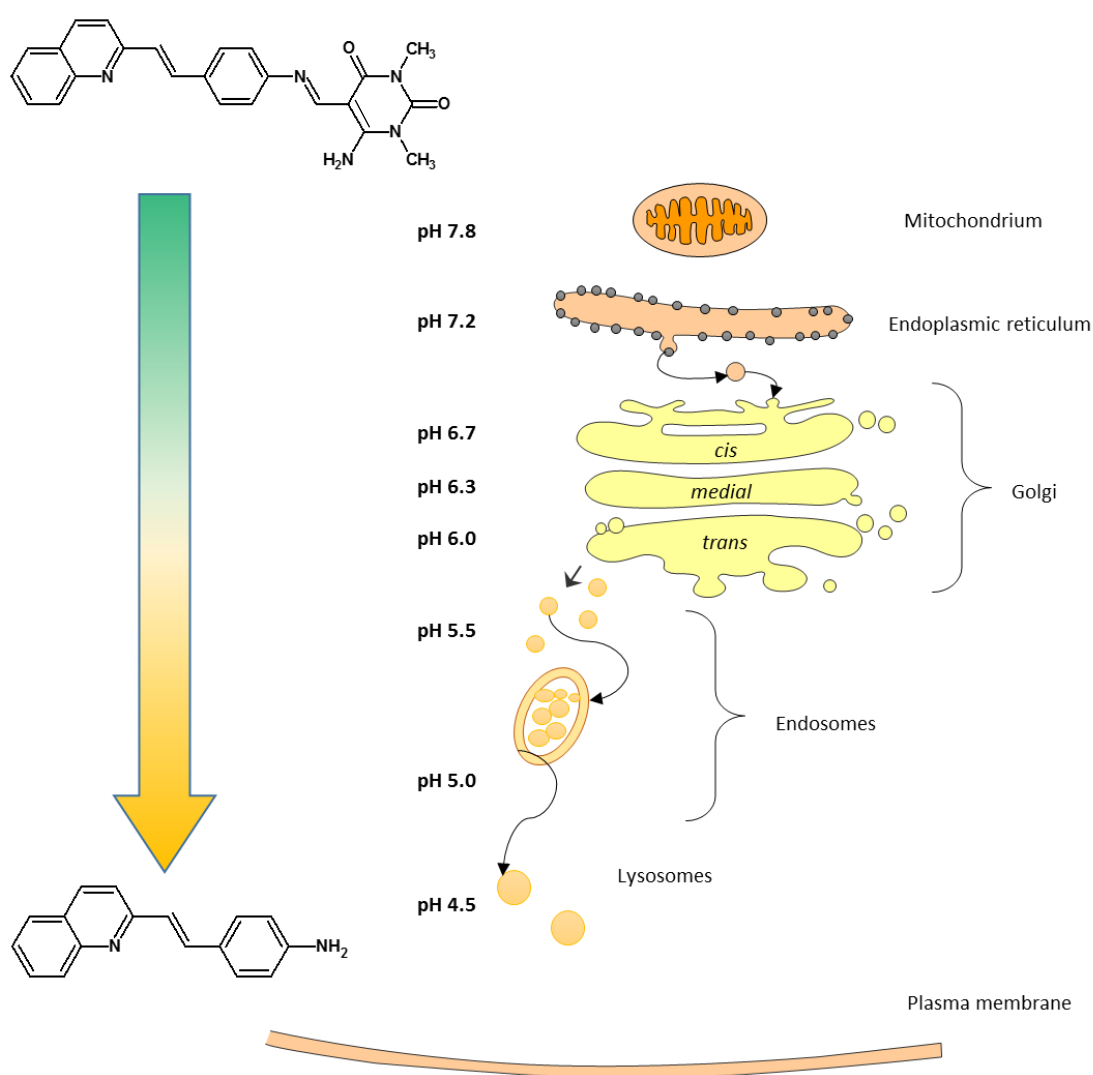
Własności spektroskopowe związków 6s i SC2 takie jak duże przesunięcie Stokesa, absorpcja światła w zakresie powyżej 370 nm oraz stabilność w środowisku wodnym umożliwia wykorzystanie ich jako barwników do obrazowania komórkowego. Niemniej jednak, w takim przypadku bardzo ważną cechą jest brak aktywności barwnika względem układów biologicznych. Aby dokładniej określić potencjał związków jako barwników komórkowych, wykonano testy przeżywalności (MTS) na liniach komórkowych nowotworu jelita grubego (HCT116) oraz ludzkich fibroblastach (NHDF). Nie zaobserwowano jednak żadnej aktywności cytotoksycznej względem badanych komórek w zakresie stężeń stosowanych w eksperymentach wybarwiania komórkowego. (Tabela 16).

Tabela 16. Cytotoksyczność związków 6s i SC2 względem linii komórkowej HCT116 nowotworu jelita grubego oraz komórek prawidłowych linii NHDF ludzkich fibroblastów.

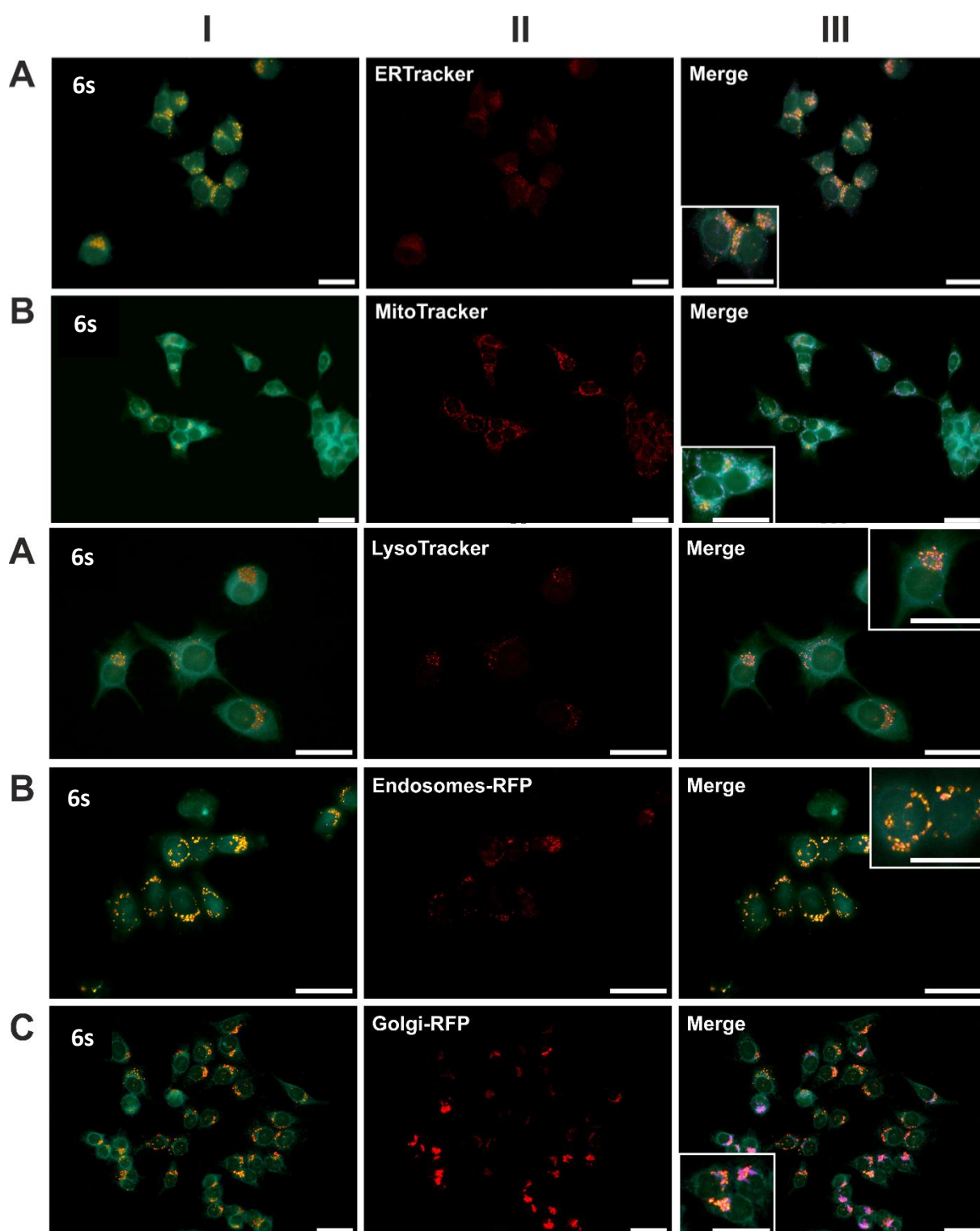
związek	IC ₅₀ [μM]	
	HCT116	NHDF
6s	>25	>25
SC2	>25	>25

Innymi słowy, inkubacja ze związkami 6s oraz SC2 nie wpłynęła na żywotność komórek normalnych, ani nowotworowych. Jednocześnie, odpowiednia lipofilowość związku 6s ($\log P=3,34$) pozwala mu na szybką penetrację oraz dobrą akumulację w błoniastych organellach takich jak mitochondria, aparat Golgiego czy lizosomy, co można było zaobserwować już po 1 h od czasu inkubacji. Co więcej, właściwości absorpcyjne badanego związku umożliwiają wzbudzenie go przy użyciu barwnika DAPI jako źródła ekscytacji, z wykorzystaniem dwóch różnych filtrów fluorescencyjnych – UV-2A (długość fali wzbudzenia 330 – 380 nm) oraz B-2A (długość fali wzbudzenia 450 – 490 nm). W wyniku naświetlania komórek światłem o wyższej energii (330 – 380 nm) zaobserwowano dwukolorową fluorescencję. Następnie, zbadano to zjawisko przeprowadzając eksperymenty kolokalizacji w komórkach linii HCT116 za pomocą komercyjnych barwników komórkowych specyficznych dla poszczególnych organelli takich jak: lizosomy (LysoTracker® Red DND-99), endosomy (CellLight® Early Endosomes-RFP, BacMam 2.0), aparat Golgiego (CellLight® Golgi-RFP, BacMam 2.0), retikulum endoplazmatyczne (ER-Tracker™ Red BODIPY® TR

Glibenclamide) i mitochondria (MitoTracker Orange) (Rysunek 44). W rezultacie ustalono, że zielona fluorescencja pochodzi od związku 6s kumulującego się w błonach komórkowych oraz organellach z nimi powiązanych takich jak mitochondrium lub siateczka endoplazmatyczna. Natomiast, za charakterystyczną emisję światła pomarańczowego odpowiada sprotonowany produkt rozkładu związku 6s (SC2), który pojawia się głównie w organellach o kwaśnym odczynie. To jest, zgodnie ze szlakiem endocytotycznym, we wczesnych endosomach, gdzie pH wynosi 5,5, a następnie spada do 5,0 w późnych endosomach oraz przede wszystkim w lizosomach, gdzie następuje spadek wartości pH do ok. 4. (Rysunek 45) [91], [92].



Rysunek 45. Schemat przedstawiający ścieżkę rozkładu związku 6s do związku SC2 wraz ze zmianami pH zachodzącymi w komórce.



Rysunek 44. Zdjęcia mikroskopowe komórek nowotworowych jelita grubego (HCT116) inkubowanych ze związkiem 6s (25 μM) przez 2 h w temperaturze 37 °C. Jako źródło wzbudzenia użyto filtr DAPI - UV-2A (długość fali wzbudzenia 330–380 nm, filtr barierowy BA420). Zdjęcia prezentują kolokalizację badanego barwnika z innymi komercyjnymi

barwnikami specyficznymi dla danych organelli - lizosomy(A), endosomy (B) i aparat Golgiego (C). Pierwsza kolumna przedstawia komórki wybarwione za pomocą związku 6s, środkowa kolumna – komórki wybarwione za pomocą barwników komercyjnych, ostatnia kolumna – nałożony obraz w celu określenia stopnia pokrycia się wybarwionych struktur. Białe wskaźniki skali odpowiadają 50 μm .

Ilościowa ocena stopnia kolokalizacji sprotonowanego związku SC2 została wykonana za pomocą metod Pearson'a i Manders'a. Współczynniki korelacji dla każdego nałożonego obrazu zostały obliczone z użyciem programu ImageJ i przedstawione w tabeli poniżej (Tabela 17).

Tabela17. Wskaźniki korelacyjne dla badanych organelli

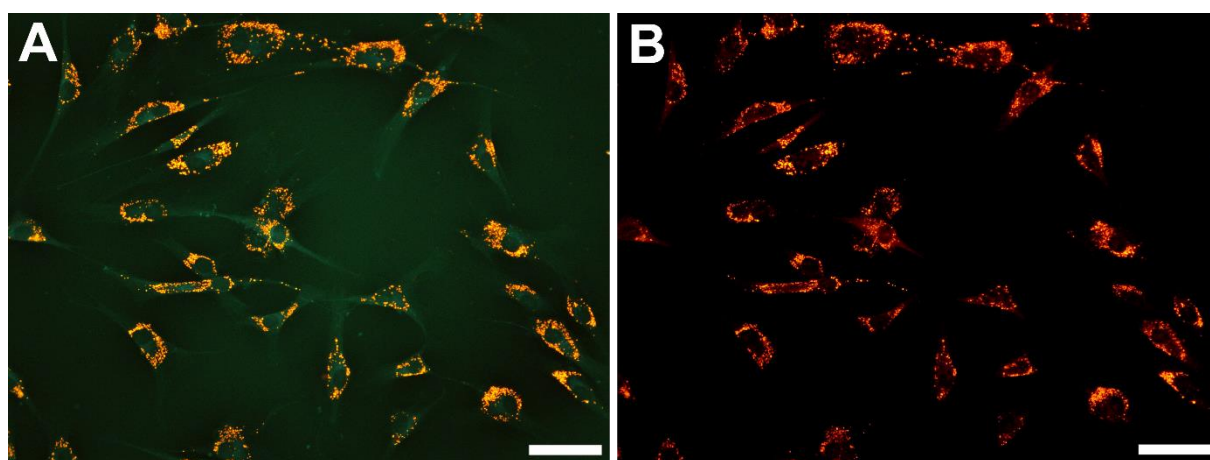
	Lizosomy pH 4.5	Endosomy pH 5.0-5.5	Apparat Golgiego pH 6.0-6.7	Retikulum endoplazmatyczne pH 7.2	Mitochondrium pH 7.8
wskaźnik Pearson'a	0,684	0,731	0,371	0,352	0,124
wskaźnik Manders'a	0,701	0,982	0,353	0,206	0,073

Opierając się na uzyskanych danych, stwierdzono, że badany barwnik (SC2) przejawia największą kolokalizację w przypadku endosomów oraz lizosomów (współczynnik Pearson'a jak i Manders'a wynosi dla nich ponad 0,6, co w tego typu zastosowaniach należy interpretować jako silną korelację). Zaobserwowano także delikatny sygnał pochodzący od aparatu Golgiego, gdzie współczynniki korelacji wynoszą odpowiednio 0,371 i 0,353. Prawdopodobnie ma to związek z faktem, że struktury szlaku endocytotycznego mają swój początek w sieci aparatu Golgiego.

Jak wspomniano wcześniej, użycie wyżej energetycznego źródła wzbudzenia skutkuje pojawieniem się podwójnej fluorescencji pochodzącej od dwóch różnych związków obecnych w komórkach. Związek 6s kumuluje się prawie we wszystkich błonach komórkowych, natomiast sprotonowany produkt jego rozkładu (SC2) jest obecny jedynie w kwaśnych organellach. Możliwe jest jednak uzyskanie selektywnego obrazu organelli nasyconych SC2.

W tym celu użyto filtra fluorescencyjnego o dłuższej fali ekscytacji (450 – 490 nm), dostarczając energii odpowiedniej do wzbudzenia jedynie związku SC2. W rezultacie otrzymano zdjęcie organelli z charakterystyczną pomarańczową fluorescencją, bez dodatkowej emisji światła zielonego. Dodatkowe eksperymenty wybarwienia przeprowadzono na fibroblastach (NHDF), które posiadają inny rozkład kwaśnych organelli w porównaniu z komórkami nowotworowymi. W ten sposób uzyskano potwierdzenie, że związek ten znajduje zastosowanie zarówno w komórkach rakowych, jak i zdrowych.

Na rysunku zamieszczonym poniżej widoczne są dla porównania dwa zdjęcia mikroskopowe fibroblastów wzbudzanych różną długością fali.



Rysunek 46. Zdjęcia mikroskopowe fibroblastów (NHDF) inkubowanych z barwnikiem 6s (25 μ M, 2 h, 37 $^{\circ}$ C). Źródło wzbudzenia: DAPI (filtr UV-2A ; długość fali wzbudzenia: 330–380 nm; filtr barierowy BA420) (A) oraz filtr B-2A (długość fali wzbudzenia: 450–490 nm; filtr barierowy: BA520) (B). Białe wskaźniki skali odpowiadają 50 μ m.

3.4.2 6s jako sensor jonów Zn^{2+}

3.4.2.1 Znaczenie jonów cynku

Cynk, jako jeden z mikroelementów pełni niezaprzeczalnie istotną rolę w naszym organizmie. Jest składnikiem wielu białek i enzymów, zarówno jako element strukturalny jak i część katalityczna, dlatego jego stężenie ma duży wpływ na wiele szlaków metabolicznych. Jest również zaangażowany w apoptozę, ekspresję genów, podziały komórkowe, różnicowanie komórek oraz neurotransmisję [93][94]. Ponadto, istnieją doniesienia sugerujące, że zaburzenia komórkowej gospodarki cynku (miedzi i żelaza również) mogą mieć wpływ na rozwój chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera [95][96]. Za jedną z przyczyn rozwoju tej choroby uznawane jest tworzenie się neurotoksycznych agregatów białek β - amyloidowych, tzw. płytek starczych. Jony metali, takie jak Zn^{2+} , wspomagają tę agregację w warunkach *in vitro* [97]. Dlatego też, utrzymanie lub przywrócenie prawidłowego stężenia tych jonów wydaje się być dobrym podejściem w leczeniu neurotoksyczności. Mając na uwadze te fakty, poszukiwanie fluorescencyjnych sensorów jonów cynku nabiera dużego znaczenia.

3.4.2.2 Chinolina w projektowaniu sensorów cynku

Przez ostatnie pięćdziesiąt lat pojawiło się wiele sensorów opartych na strukturze chinoliny. Jednak wiele z nich nie spełnia warunków barwnika odpowiedniego do stosowania w żywych komórkach. Pierwszą grupą tych związków były sulfonamidochinoliny przedstawione w 1968 roku przez Bozhevolnova i Serebriakovą jako sondy fluorescencyjne aktywowane jonami cynku i kadmu [98]. Następnie w 1987 roku Frederickson zaprezentował metodę histochemicznego barwienia cynku w mózgu, gdzie sensorem była 6-metoksy-(8-paratoluenosulfonoamido)-chinolina – TSQ. Związek ten wykazywał jednak krótką retencję w komórkach, co ograniczało jego zastosowanie [99]. Pomimo tego, TSQ jest nadal używany jako powszechnie znany barwnik. Istnieją doniesienia o zastosowaniu TSQ do śledzenia transporterów cynku w układzie nerwowym [100] czy barwienia bogatych w cynk komórek wysp trzustkowych [101]. W 1993 roku Zalewski przedstawił nową ulepszoną wersję TSQ – Zinquin. Mała modyfikacja podstawnika w pozycji C6 – zamiana grupy metoksy na estrową - zapewniła dłuższą retencję. Jako ester, Zinquin po wprowadzeniu do komórek jest rozkładany przez esterazy i skutecznie więziony w komórkach. Jest drugim barwnikiem który pozostał w powszechnym użyciu. Pierwszy raz został zastosowany do określenia współzależności między apoptozą m. in. ludzkich limfocytów białaczkowych a zawartością cynku w tych komórkach

[102]. Poza tym był także wykorzystywany jako indykator jonów cynku w wielu innych typach komórek ssaków [103]. Długość fali wzbudzenia Zinquin wynosi 370 nm, co stwarza pewne problemy przy wybarwianiu żywych komórek. Obecnie na rynku możemy znaleźć sensory o wyższych długościach fal wzbudzenia i emisji. Jednak w większości przypadków są one oparte na strukturze fluoresceiny, co pociąga za sobą większą masę cząsteczkową, gorszą rozpuszczalność w wodzie i małe przesunięcie Stokesa. Różnica między maksimami pasm absorpcji i emisji, dla pochodnych fluoresceiny wynosi zazwyczaj 20 -25 nm, co negatywnie odbija się na czułości w metodach fluorescencyjnych. Większe przesunięcie umożliwia dokładniejszy pomiar, ze względu na efektywne rozdzielanie luminescencji próbki od promieniowania źródła wzbudzenia. Co więcej, wiele komercyjnie dostępnych sensorów posiada dużą wydajność kwantową jeszcze przed związaniem z jonami metalu (np. ZP1 – 0,38, ZP2 -0,25), co także nie jest pożądaną cechą. Kolejnym problemem w wykrywaniu cynku za pomocą sensorów jest brak ich selektywności wobec jonów kadmu Cd^{2+} , ze względu na podobne właściwości wynikające z położenia w tej samej grupie układu okresowego. Obecnie istnieje kilka barwników opartych na strukturze 8-aminochinoly, które odznaczają się wysoką selektywnością względem jonów cynku, nawet w obecności Cd^{2+} .

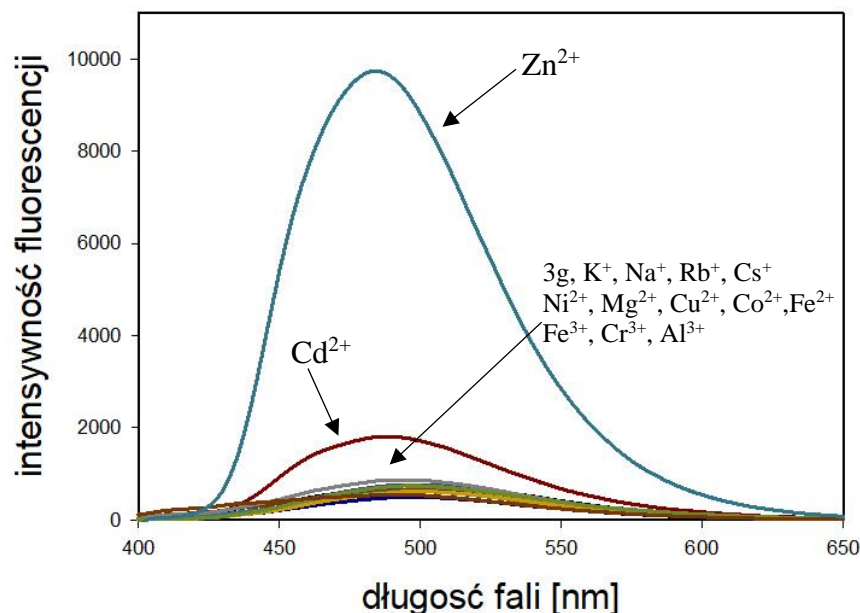
Tabela 18. Tabela prezentująca przykładowe komercyjnie dostępne fluorosensory jonów cynku Zn^{2+} . Informacje zebrane przez grupę badawczą Uniwersytetu w Colorado, ND – brak danych [4]

sensor	wzbudzenie		emisja				przesunięcie Stokesa
	λ_{free} (nm)	λ_{bound} (nm)	λ_{free} (nm)	Φ_{free}	λ_{bound} (nm)	Φ_{bound}	(nm)
TSQ	380	380	495	ND	495	0,1	115
Zinquin	370	370	490	ND	490	ND	120
ZP1 (Zinpyr-1)	515	507	531	0.38	527	0,87	20
ZP2	498	490	522	0.25	517	0,92	37
ZP3	502	492	521	0.15	516	0,92	24

ZP4	506	495	521	0.06	515	0,34	20
ZPF1	533	525	547	0.11	544	0,55	19
ZPF3	520	510	537	0.14	533	0,6	23
ZPP1	505	500	532	0.05	523	0,7	23
ZS1	510	501	531	0.5	526	0,7	25
QZ1	505	498	524	0.024	524	0,78	26
QZ2	499	489	520	0.004	518	0,7	29
Fluo-Zin 1	496	496	515	ND	515	ND	19
Newport Green PDX	495	495	520	ND	520	ND	25
ZIMIR	493	493	515	0.003	515	0,23	22
RhodZin - 3	550	550	575	ND	575	ND	25
ZRL1	569	569	595	<0.001	595	0,22	26
Rhod – 5f	571	571	594	0.28	594	0,13	23

3.4.2.3 Właściwości kompleksujące związku 6s

Związek 6s posiada w swojej strukturze podstawniki charakterystyczne dla chelatorów cynku. Z tego powodu wykonano dodatkowe badania mające na celu ustalić jego zdolności kompleksujące. W pierwszej kolejności sprawdzono odpowiedź barwnika na obecność różnych jonów w roztworze. W tym celu przygotowano próbki zawierające badany związek w DMSO oraz zarejestrowano zmiany fluorescencji po dodaniu odpowiednich jonów metali w proporcji 1:5. Na załączonym rysunku widać, że związek wybiórczo reaguje na jony cynku Zn^{2+} wykazując przesunięcie hipsochromowe o 12 nm oraz ~20 – krotny wzrost intensywności fluorescencji (Rysunek 47). Widma absorpcji nie są załączone gdyż nie zaobserwowano żadnych znacznych zmian w pasmach po wprowadzeniu cynku do roztworu próbki.

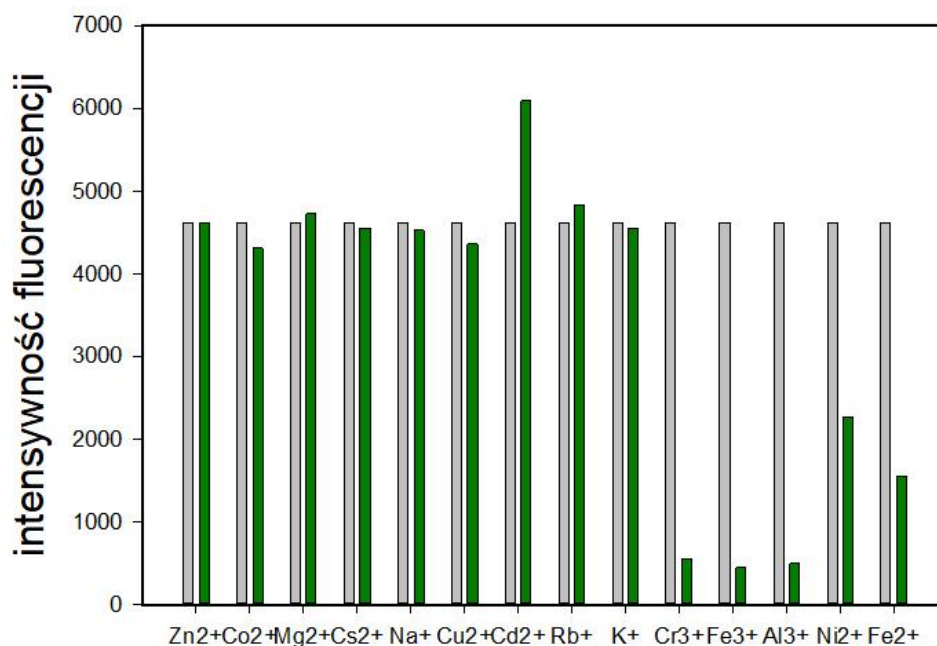


Rysunek 47. Widma emisji roztworów zawierających związek 6s (20 μ M) oraz odpowiednie jony metali (100 μ M) w stosunku 1:5 w DMSO. Do pomiarów zastosowano długość fali ekscytacji 386 nm.

Dodatkowo 6s reaguje na obecność jonów Cd^{2+} , co jest dość powszechnym problemem w tego typu analizie. Jednak znaczna różnica we wzroście intensywności po dodaniu cynku i kadmu, oraz realne bardzo niskie stężenia jonów kadmu w komórce, pozwalają na nazwanie związku 6s selektywnym w stosunku do jonów cynku.

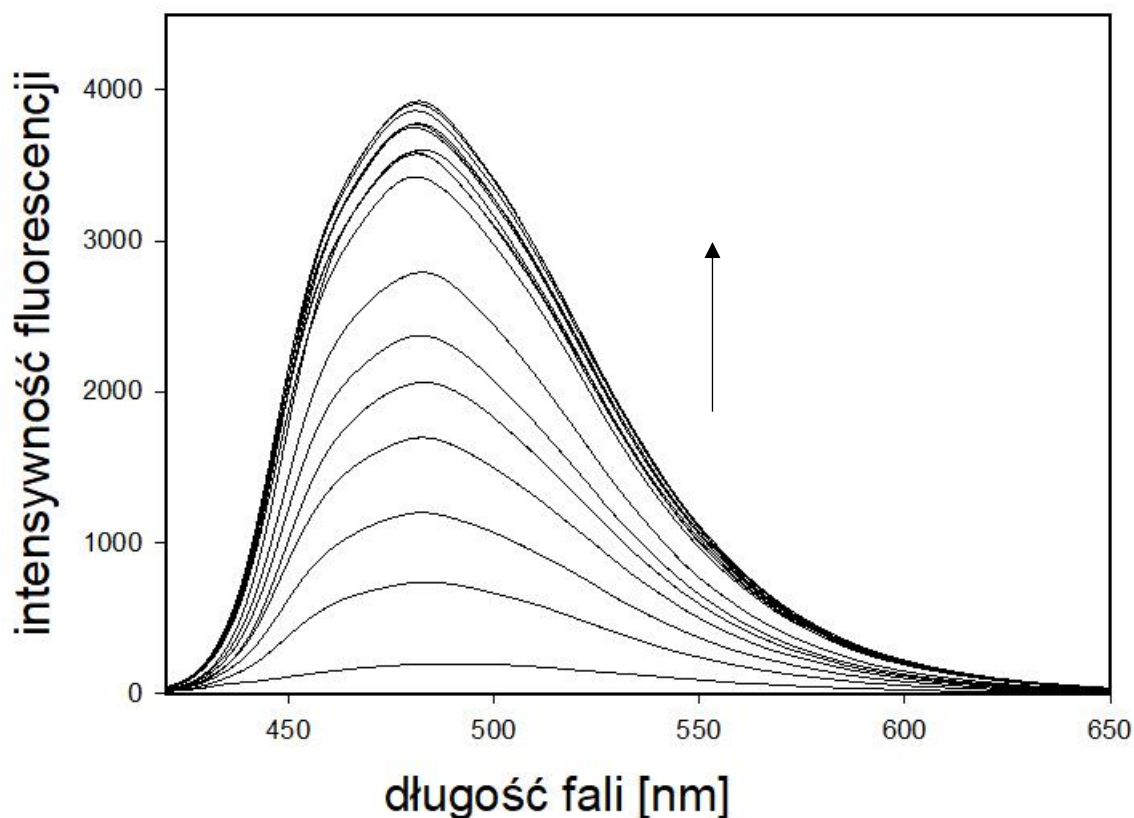
Następnie zbadano specyficzność barwnika poprzez pomiar widm emisji roztworów zawierających związek 6s, jony cynku oraz dodatkowe jony innych metali. Na podstawie uzyskanych wyników sporządzono histogram przedstawiający wpływ obecności innych jonów na proces wykrywania cynku w roztworze (Rysunek 48). Jednowartościowe jony metali takie jak Cs^+ , Na^+ , K^+ czy Rb^+ nie mają wpływu na proces wykrywania jonów cynku przy pomocy związku 6s. Podobnie, w przypadku dodania większości dwuwartościowych jonów proces fluorescencji nie został zaburzony. Szczególnie zaskakujący jest brak zmian w obecności jonów Cu^{2+} , gdyż w wielu przypadkach miedź powoduje spadek intensywności fluorescencji [104][105][106]. Z drugiej strony, łatwo zauważyć, że sygnał wywołany obecnością jonów kadmu prawdopodobnie sumuje się z sygnałem wywołanym jonami cynku, gdyż w roztworze

zawierającym oba te jony zaobserwowano większą intensywność emisji światła. Dodatkowo, jony Ni^{2+} oraz Fe^{2+} znacząco osłabiają fluorescencję, jednakże, do poziomu przy którym wciąż jest zauważalna. Największy wpływ na proces wykrywania cynku w roztworze mają jony trójwartościowe – Al^{3+} , Fe^{3+} oraz Cr^{3+} , których obecność powoduje praktycznie całkowite wygaszenie fluorescencji.



Rysunek 48. Histogram przedstawiający wpływ obecności innych jonów w roztworze na proces wykrywania jonów cynku przez związek 6s. Szare słupki prezentują intensywność fluorescencji podczas gdy w badanej próbce są obecne tylko jony cynku oraz ligand (w stosunku 2:1). Zielone słupki prezentują intensywność fluorescencji w obecności liganda, jonów cynku oraz dodatkowych jonów wymienionych pod słupkami (w stosunku 1:2:2). Pomiarów dokonano w DMSO, stosując długość fali wzbudzenia 386 nm.

W celu dokładniejszego zbadania właściwości kompleksujących związku przeprowadzono miareczkowanie fluorymetryczne jonami cynku, a wykresy przedstawiające otrzymane wyniki zaprezentowano poniżej (Rysunek 49). Wraz ze wzrostem stężenia jonów Zn^{2+} , zauważalny jest proporcjonalny wzrost fluorescencji, a także cofanie się pasma w stronę fal krótszych (Tabela 19).



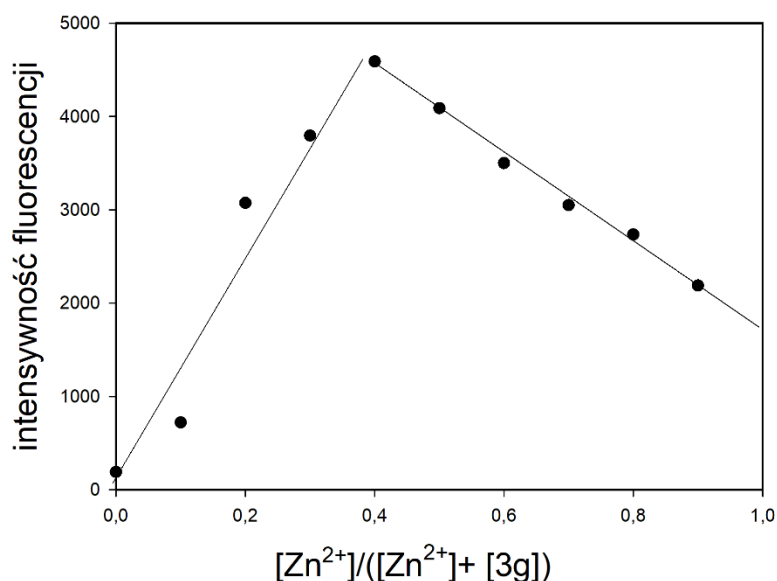
Rysunek 49. Widma emisyjne prezentujące zależność intensywności fluorescencji od ilości jonów cynku Zn^{2+} (wzrastający stosunek względem liganda od 0 – 2 ekwiwalentów) w roztworze związku 6s przy długości fali ekscytacji 386 nm.

Tabela 19 Tabela prezentująca zmiany właściwości spektroskopowych związku 6s po skompleksowaniu jonów cynku Zn^{2+} .

związek	Położenie pasm absorpcji ^a λ / nm	Maksimum fluorescencji λ_{max} / nm	Intensywność fluorescencji	Przesunięcie Stokesa /nm
6s	386	495	192	114
6s + ZnCl_2 (1:1)	386	483	3920	93

Dodatkowo, aby określić stechiometrię wiązania związku 6s z Zn^{2+} zastosowano metodę Job'a zwaną metodą serii izomolowych (Rysunek 50). W tym przypadku, polegała ona na pomiarze zmian fluorescencji w zależności od udziału frakcji molowych liganda i jonów cynku, przy

jednoczesnym zachowaniu stałego całkowitego stężenia molowego. Maksymalną intensywność emisji odczytano dla frakcji molowej 0,4; co wskazuje na stosunek wiązania 1:2.

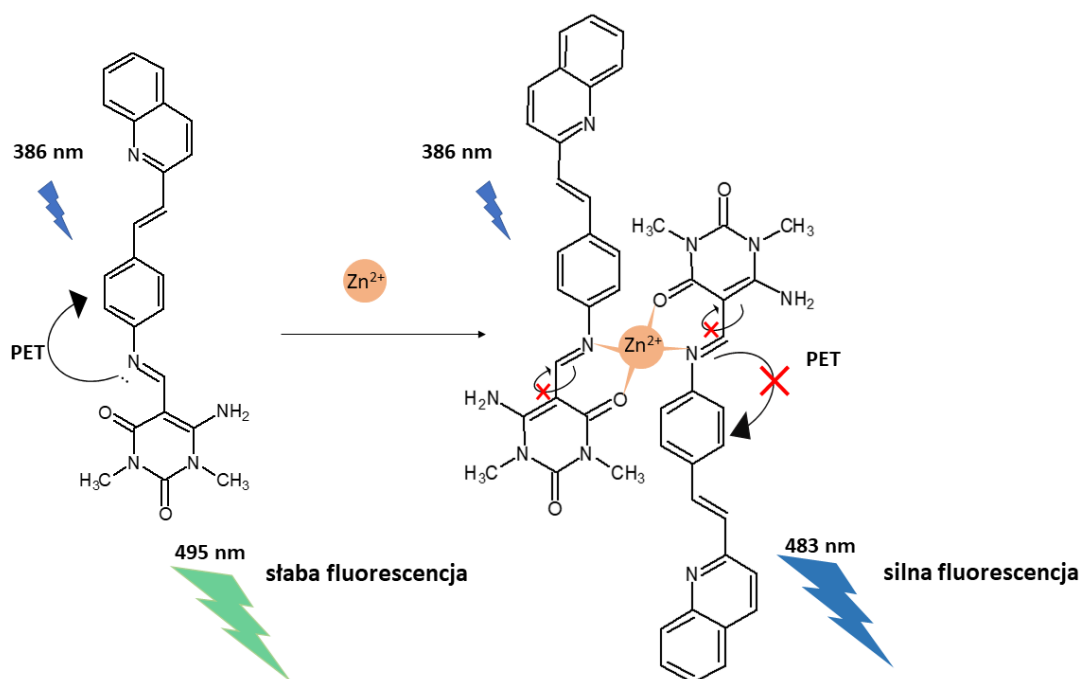


Rysunek 50. Wykres Job'a prezentujący zmiany intensywności fluorescencji przy długości 483 nm w zależności od ułamka molowego jonów cynku w roztworze. Całkowite stężenie liganda oraz dodanych jonów wynosiło 20 μ M. Pomiarów dokonano w DMSO.

3.4.2.4 Teorie wyjaśniające odpowiedź liganda na jony cynku

Pomimo intensywnych prób nie udało się uzyskać struktury krystalicznej, a przez to ustalić rzeczywistej struktury kompleksu. W związku z tym, podjęto próbę określenia mechanizmu wiązania jonów cynku wykorzystując zebrane dotychczas dane. Opierając się na wynikach uzyskanych metodą Job'a oraz analizując różne możliwości kompleksowania, zaproponowano, że w wiązanie jonów cynku zaangażowane są: atom azotu wiązania iminowego ($C=N$) posiadający wolną parę elektronową oraz sąsiadujący atom tlenu wiązania karbonylowego ($C=O$) (Rysunek 51). W ten sposób, angażują się dwie cząsteczki liganda (co jest w zgodzie z danymi spektroskopowymi) i tworzy się kompleks, gdzie liczba koordynacyjna cynku wynosi 4. Z opublikowanych badań wynika, że cynk obecny w enzymach czy palcach cynkowych (domena białkowa białek wiążących DNA) występuje najczęściej właśnie w postaci tetraedrycznych kompleksów [107].

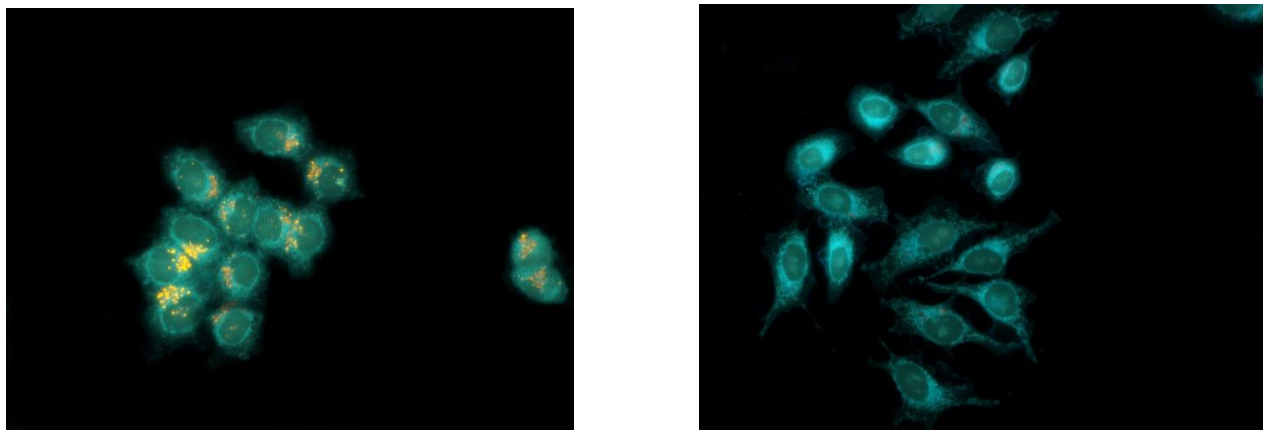
Jedną z możliwych przyczyn wzrostu fluorescencji związku 6s po skompleksowaniu jonów cynku jest zahamowanie procesu przeniesienia elektronu w stanie wzbudzonym (PET), który jest główną przyczyną procesu wzmocnienia fluorescencji w wyniku chelatowania (CHEF). Przeskok elektronu wolnej pary atomu azotu na jednostkę fluorofora w stanie wzbudzonym jest procesem konkurencyjnym do procesu fluorescencji (jako ścieżka dezaktywacji). W obecności metalu, proces ten zostaje zablokowany oraz nie dochodzi do rozdzielania ładunków w stanie wzbudzonym, co skutkuje znacznym wzrostem intensywności fluorescencji [13]. Dodatkowo, związanie jonów cynku powoduje „usztynwienie” całej cząsteczki oraz zahamowanie możliwej rotacji wzdłuż wiązania iminowego C=N. Zmiany strukturalne oraz zmiana rozkładu ładunku przyczyniają się jednocześnie do przesunięcia hipsochromowego pasma emisji kompleksu (Rysunek 51) [108][109].



Rysunek 51. Rysunek przedstawiający zaproponowany mechanizm kompleksowania jonów cynku i aktywacji fluorescencji dla otrzymanego związku 6s.

3.4.2.5 Wykrywanie cynku w komórkach nowotworowych

W celu ustalenia potencjału aplikacyjnego związku jako sensora w komórkach, wykonano barwienia komórek nasyconych jonami cynku. Eksperymenty te były przeprowadzone w dwojaki sposób. W pierwszym przypadku jony cynku zaaplikowano po wcześniejszym okresie inkubacji barwnika (Rysunek 52a). W drugim, jony cynku zostały podane jednocześnie z barwnikiem (52b). Wyniki tych doświadczeń przedstawiają zdjęcia poniżej.



Rysunek 52. Zdjęcia przedstawiające komórki nowotworowe linii HCT116 inkubowane ze związkiem 6s oraz jonami cynku dodanymi a) po okresie inkubacji barwnika b) jednocześnie z barwnikiem

Otrzymane rezultaty różnią się od siebie w zależności od sposobu wprowadzenia jonów cynku. Na pierwszym zdjęciu widoczna jest pomarańczowa fluorescencja pochodząca od kwaśnych organelli w komórce. Natomiast po jednoczesnym podaniu barwnika z jonami cynku, nie obserwujemy już dwukolorowej emisji światła. Taki stan rzeczy potwierdza teorię rozkładu barwnika w kwaśnym środowisku lizosomów. Innymi słowy, związek który uległ degradacji po pewnym okresie inkubacji, nie jest w stanie skompleksować dodanych później jonów. W drugim przypadku można przyjąć, że tempo wiązania jonów przez podany ligand jest na tyle szybkie, że powstaje kompleks, który nie wnika do lizosomów. W ten sposób obserwujemy tylko niebieskawą fluorescencję od kompleksu ligand – Zn^{2+} .

4 Podsumowanie

W ramach niniejszej pracy doktorskiej zsyntezowano 9 związków, w tych 7 nowych pochodnych nieopisanych dotychczas w literaturze. Wszystkie otrzymane związki oparte są na strukturze styrylochinoliny, a znaczna ich część posiada dodatkowo podwójne wiązanie C=N charakterystyczne dla zasad Schiffa. Dodatkowo, przeprowadzono analizę właściwości fotofizycznych otrzymanych 7 zasad Schiffa oraz 11 pochodnych karbazolowych i bitiofenowych zsyntezowanych uprzednio w Zakładzie Chemii Nieorganicznej, Metaloorganicznej i katalizy UŚ.

4.1 Zakres przeprowadzonych analiz obejmował:

1. Analizę strukturalną otrzymanych związków za pomocą technik takich jak spektroskopia NMR, ESI-MS, HPLC.
2. Pomiary spektrofotometryczne UV-VIS oraz analizę otrzymanych wyników w celu uzyskania charakterystyki spektralnej zsyntezowanych związków (kompleksów) oraz ustalenia procesów zachodzących po wzbudzeniu, w tym: widma absorpcji, widma emisji, wydajności kwantowe, solwatochromizm, zależność emisji od pH. Zastosowano także równanie Lipperta- Matagi w celu określenia zmian momentu dipolowego w stanie wzbudzonym.

W przypadku kompleksu z cynkiem dodatkowo wykonano miareczkowanie fluorymetryczne, pomiary konkurencyjności oraz zastosowano metodę Job'a w celu określenia stechiometrii kompleksowania.

3. Obliczenia teoretyczne z użyciem metody funkcjonału gęstości DFT jako uzupełnienie charakterystyki spektralnej, w tym: optymalizacje stanów podstawowych i wzbudzonych, wizualizacje orbitali zaangażowanych w proces wzbudzenia, mapy potencjałów, zmiany geometrii cząsteczki
4. Badania biologiczne mające na celu określenie potencjału aplikacyjnego otrzymanych związków pod kątem ich zastosowania jako sensory komórkowe, w tym: oznaczenia cytotoksyczności in vitro na nowotworowych liniach komórkowych m.in. ludzkiego raka jelita grubego oraz linii komórek prawidłowych NHDF ludzkich fibroblastów, ustalenie miejsca kumulacji barwników w komórce z zastosowaniem metody współbarwienia pod mikroskopem fluorescencyjnym, zbadanie zachowania się

barwników w komórce (badania biologiczne przeprowadzane były we współpracy z dr Katarzyną Malarz)

4.2 Wnioski

4.2.1 Związki 6l-6r

Otrzymane związki posiadają dobre właściwości spektroskopowe – odpowiedni profil wzbudzenia i emisji oraz bardzo duże przesunięcie Stokesa, co jest ważną cechą dla metod fluorescencyjnych. Dodatkowo, badane związki przejawiają pozytywny solwatochromizm, co oznacza, że w polarnym środowisku (także w środowisku komórki) emitują światło przy wyższych długościach fali. Otrzymane dane eksperymentalne zestawiono z wynikami obliczeń teoretycznych, dzięki którym duże przesunięcie Stokesa powiązano z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku oraz ze zmianami strukturalnymi zachodzącymi w procesie wzbudzenia. Testy biologiczne potwierdziły, że zsyntezowane związki są bezpieczne dla komórek i pod tym względem, mogą być stosowane jako sondy komórkowe. Niestety, część związków okazała się być niestabilna w środowisku wodnym, co wyklucza je z eksperymentów wymagających dłuższego czasu inkubacji. Najbardziej trwałe związki – 6o i 6p – z powodzeniem zostały zastosowane do wybarwiania komórek nowotworowych. W wyniku tego eksperymentu ustalono ich preferowane miejsca kumulacji – błoniaste struktury komórki, a w szczególności retikulum endoplazmatyczne oraz mitochondria. W porównaniu do badanych wcześniej styrylochinolin, przedłużenie układu wiązań sprzężonych poprzez dodanie wiązania iminowego $C=N$, zdecydowanie spowodowało przesunięcie pasm absorpcji i emisji w stronę fal dłuższych. Obniżyło to jednak także wydajność fluorescencji, co może być spowodowane obecnością wolnej pary elektronowej na atomie azotu oraz możliwą izomeryzacją wiązania iminowego w stanie wzbudzonym. Natomiast, w porównaniu do pochodnych chinoliny z ugrupowaniem bitiofenowym i karbazolowym, zdecydowaną pozytywną zmianą jest wzrastanie intensywności emisji w środowisku polarnym (a nie spadek), co wspomaga proces fluorescencji zachodzący po wprowadzeniu barwnika do komórki.

4.2.2 Związek 6s

Najbardziej wnikliwie przeanalizowano związek 6s oraz produkt jego rozpadu, jeden z substratów – związek SC2. Ustalono, że związek 6s może służyć jako „pro-barwnik”, czyli nośnik prawidłowego fluorofora, który zostaje aktywowany dopiero w środowisku kwaśnym.

Związek ten stanowi interesujące nowe narzędzie do badania zmian zachodzących wewnątrz komórki. Przejawia on właściwości, dzięki którym może być stosowany jako barwnik do obrazowania kwaśnych organelli takich jak lizosomy czy endosomy lub do kontrolowania zmian pH. Prawdopodobnie zestawienie jego odpowiedniej lipofilowości, wielkości oraz obecność grupy $-NH_2$ umożliwia mu dotarcie i akumulację w tych strukturach. Posiada dobry profil wzbudzenia i emisji, co umożliwia jego bezpieczne aplikowanie do komórek. Dodatkowo, dużym atutem związku jest dwukolorowa fluorescencja, która zachodzi przy wzbudzeniu tylko jedną długością fali, a zmieniając źródło ekscytacji możemy otrzymać wybiórczy obraz organelli o niskim pH. Obserwowany sygnał w postaci fluorescencji jest stabilny, nie ulega fotowygaszeniu, co pozwala na zastosowanie go w eksperymentach wymagających większej ilości czasu. Co więcej, związek jest trwały w środowisku wodnym oraz nie przejawia aktywności biologicznej, a eksperymenty wykonane na liniach komórkowych HCT116 i NHDF świadczą o tym, że 6s może być używany zarówno w komórkach nowotworowych jak i zdrowych.

Intensywność fluorescencji sygnału pomarańczowego (SC2) jest jednak zdecydowanie większa niż sygnału niebiesko-zielonego (6s). Biorąc pod uwagę to oraz własności kompleksujące związku 6s ustalono, że może on także służyć jako sensor jonów Zn^{2+} z pewnymi ograniczeniami. W wyniku analizy zaproponowano mechanizm kompleksowania 2:1 (L:M), a za proces odpowiedzialny za wzrost fluorescencji po związaniu jonów cynku uznano przede wszystkim PET-CHEF.

4.3 Perspektywy badawcze

Zasady Schiffa nie są często wybieraną grupą związków do eksperymentów wybarwiania organelli komórkowych. Powodem takiego stanu rzeczy jest wiele ograniczeń wynikających z właściwości tych związków. Jednak, odpowiednie wykorzystanie tych cech może sprawić, że staną się one interesującym obiektem badań. Kwestie, które są warte uwagi w przyszłości to modyfikacje struktury związków poprawiające ich rozpuszczalność, a także kontrolowany rozkład związku przy określonych wartościach pH, który pozwoliłby przykładowo na rozróżnienie komórek zdrowych od komórek nowotworowych. Interesujące byłoby także określenie selektywności danych barwników w zależności od czasu ich inkubacji. Występuje bowiem „zjawisko konkurencyjności” organelli, co oznacza, że wprowadzony barwnik wybarwia struktury w określonej kolejności [88].

5. Część eksperymentalna

5.1 Metody badań fizykochemicznych

5.1.1 Pomiar temperatury topnienia

Temperatury topnienia oznaczano przy użyciu aparatu Optimelt MPA-100 (SRS, Stanford CA) wyposażonego w wewnętrzną kamerę rejestrującą zachodzące zmiany.

5.1.2 Chromatografia cienkowarstwowa TLC

Chromatografię cienkowarstwową wykonywano na płytkach aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym 40 F254 firmy Merck. Chromatogramy obserwowano pod lampą UV przy długości fali 254 lub 365 nm.

5.1.3 Oczyszczanie związków

Otrzymane związki oczyszczano za pomocą krystalizacji lub kolumny chromatograficznej przy użyciu sprzętu Combi Flash.

5.1.4 Spektroskopia NMR

Struktury nowo zsyntezowanych związków zostały potwierdzone za pomocą spektroskopii NMR. Widma ^1H NMR, ^{13}C NMR jak i widma dwuwymiarowe COSY and NOESY rejestrowano w pracowni NMR Uniwersytetu Śląskiego w Chorzowie za pomocą sprzętu Bruker AM-series, Bruker BioSpin (Corp. Germany) przy częstotliwościach 500 i 125 MHz. Jako wzorca w przypadku widm ^1H - oraz ^{13}C -NMR używano tetrametylosilanu - $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Próbkę rozpuszczano w deuterowanych rozpuszczalnikach – głównie w DMSO- d_6 .

5.1.5 ESI-MS

Wysokorozdzielcze widma masowe wykonano przy użyciu sprzętu WATERS LCT Premier XE wyposażonego w analizator czasu przelotu (TOF).

5.1.6 Eksperymenty HPLC

Eksperymenty hydrolizy otrzymanych zasad Schiffa przeprowadzono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC przy użyciu sprzętu Agilent 1260 Infinity II wyposażonego w detektory FLD oraz DAD.

5.1.7 Pomiary spektroskopowe UV-VIS

Widma absorpcyjne i emisyjne rejestrowano w pracowni SMCEBI (Śląskie Międzyuczelniane Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych), odpowiednio za pomocą spektrofotometru U-2900 (Hitachi) oraz spektrofluorymetru F-7000 (Hitachi). Pomiary prowadzono w temperaturze pokojowej, w kuwetach kwarcowych 10 mm. Długości fal wzbudzenia odpowiadały długościom fal w maksimum absorpcji dla poszczególnych związków.

Wydajności kwantowe fluorescencji określono za pomocą metody absolutnej przy użyciu sfery całkującej na spektrofluorymetrze Edynburg FLS-980 w Zakładzie Krystalografii Uniwersytetu Śląskiego. Pomiary wykonała dr Aneta Słodek.

5.1.8 Pomiar pH

Pomiary pH przeprowadzono za pomocą pH – metru z użyciem elektrody szklanej z układem odniesienia Ag/AgCl. Pomiarów dokonano w temperaturze pokojowej, w roztworach zawierających 20% wody i 80% etanolu. Warunki kwasowo – zasadowe regulowano rozcieńczonymi roztworami zasady sodowej NaOH oraz kwasu solnego HCl. Każdorazowo po zmierzeniu odczynu roztworu, wykonywano pomiar widma absorpcji i emisji.

5.2 Obliczenia teoretyczne

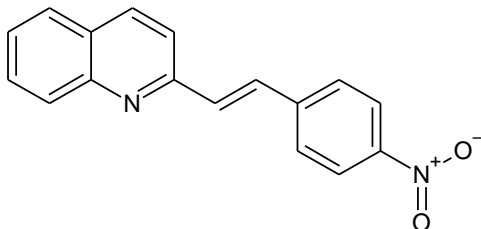
Obliczenia teoretyczne wykonano przy użyciu programu Gaussian09 z wykorzystaniem bazy funkcyjnej 6-311+g (d,p) oraz funkcjonałów B3LYP oraz CAM-B3LYP w zależności od cząsteczki. Obliczenia wykonane zostały we Wrocławskim Centrum Sieciowo – Superkomputerowym (<http://www.wcss.wroc.pl>) w ramach grantu obliczeniowego nr 18.

5.3 Synteza

Wszystkie użyte odczynniki nabyto od Sigma – Aldrich. Rozpuszczalniki używane do syntezy zasad Schiffa osuszano i przechowywano nad sitami molekularnymi 3 Å oraz 4 Å. Reakcje w polu mikrofalowym przeprowadzono z użyciem reaktora mikrofalowego firmy CEM (Matthews, NC, USA) model DISCOVERY. Reakcje przeprowadzano w hermetycznie zamkniętych, szklanych probówkach (system zamykania probówek firmy Sigma-Aldrich).

5.3.1 Otrzymywanie substratu wyjściowego do syntezy zasad Schiffa

Etap 1: 2-[(E)-2-(4-nitrofenylo)etenylo]chinolina (1):

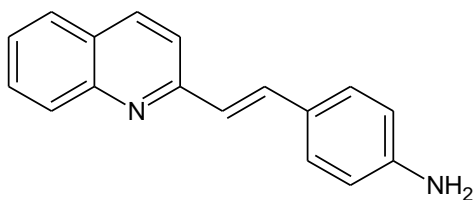


W kolbie okrągłodennej o pojemności 250 mL rozpuszczono 10 mmol chinaldyny w 40 cm³ bezwodnika octowego. Następnie dodano 10 mmol 4-nitrobenzaldehydu. Tak powstałą mieszaninę ogrzewano przez 20h w temperaturze 130°C. Po zakończonej reakcji odparowano nadmiar rozpuszczalnika na wyparce rotacyjnej. Otrzymany produkt został oczyszczony przy użyciu chromatografii kolumnowej. W wyniku reakcji uzyskano jasnożółte ciało stałe o temperaturze topnienia 167 °C, z wydajnością 73%.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.41 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.27 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.02 (dd, J = 8.2, 4.2 Hz, 3H), 8.00 – 7.90 (m, 3H), 7.78 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.60 (t, J = 7.4 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 155.27, 148.11, 147.36, 143.49, 137.24, 133.63, 132.22, 130.52, 129.30, 128.67, 128.35, 127.77, 127.17, 124.53, 120.82.

Etap 2: 4-[(E)-2-(chinolin-2-yl)etenyli]anilina (2):



W kolbie okrągłodennej rozpuszczono w etanolu związek otrzymany w pierwszym etapie syntezy (**1**). Następnie dodano bezwodnego chlorku cyny (II) SnCl₂ w proporcji 1:5. Tak otrzymaną mieszaninę ogrzewano przez 2h w temperaturze 70°C w atmosferze gazu obojętnego. Następnie mieszaninę ochłodzono, przeniesiono do zlewki z lodem i zneutralizowano 5% roztworem wodorowęglanu sodu NaHCO₃. Kolejnym etapem było

przeprowadzenie ekstrakcji przy użyciu octanu etylu, przemycie warstwy organicznej za pomocą solanki oraz wysuszenie jej nad bezwodnym siarczanem (VI) sodu Na₂SO₄. Końcowy produkt otrzymano w postaci czerwonego ciała stałego o temperaturze topnienia 174°C, z wydajnością 61%.

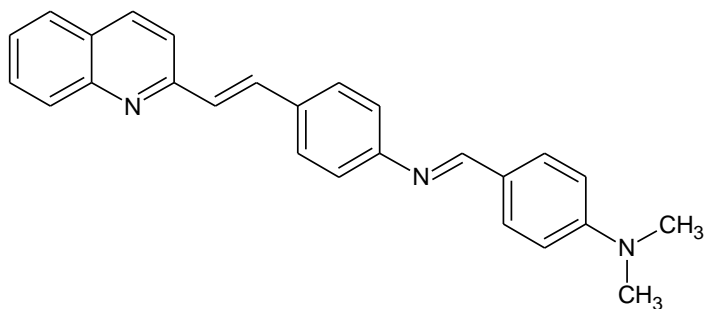
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.26 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 14.2, 8.3 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 17.8, 11.8 Hz, 2H), 7.50 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.54 (s, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 157.03, 150.39, 148.22, 136.54, 135.54, 130.07, 129.21, 128.81, 128.18, 127.10, 125.95, 124.22, 123.28, 120.06, 114.33.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 157.03, 150.39, 148.22, 136.54, 135.54, 130.07, 129.21, 128.81, 128.18, 127.10, 125.95, 124.22, 123.28, 120.06, 114.33.

5.3.2 Otrzymywanie zasad Schiffa opartych na strukturze styrylochinoliny, metoda ogólna

W probówce o pojemność 15 mL umieszczono związek otrzymany w etapie 2 (**2**) oraz odpowiedni aldehyd w stosunku molowym 1:1. Następnie dodano 5mL etanolu oraz 3 krople kwasu octowego. Probówkę szczelnie zamknięto aluminiowym kapslem z septą i poddano działaniu pola mikrofalowego przez 20 minut, w temperaturze 80°C, przy mocy 50W. Otrzymane w ten sposób związki, były następnie oczyszczane za pomocą krystalizacji z etanolu.

(N-[[4-(dimetylamino)-fenylo]metylideno]-4-[(E)-2-(chinolin-2-ylo)etenylo]anilina (6l):



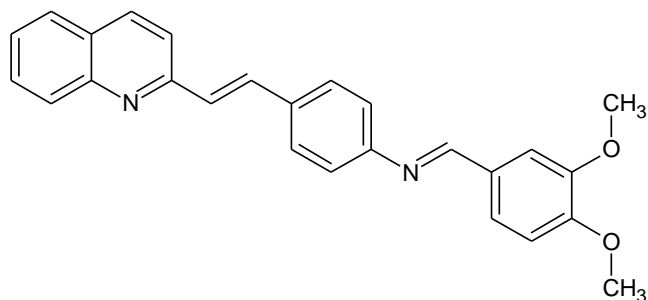
Jako produkt otrzymano żółte ciało stałe o temperaturze topnienia 202°C, z wydajnością 62%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.49 (s, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.87 (dd, *J* = 12.5, 8.8 Hz, 2H), 7.79 – 7.73 (m, 5H), 7.56 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.03 (s, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 160.31, 156.29, 153.07, 153.10, 148.24, 136.84, 134.33, 133.63, 130.88, 130.21, 129.11, 128.69, 128.22, 128.14, 127.47, 126.49, 124.40, 121.94, 120.39, 112.01.

ESI-MS obliczono dla C₂₆H₂₄N₃: 378.1970; [M+H]⁺ 378.1973

N-[(3,4-dimetoksyfenylo)metylideno]-4-[(*E*)-2-(chinolin-2-ylo)etenylo]anilina (6m):



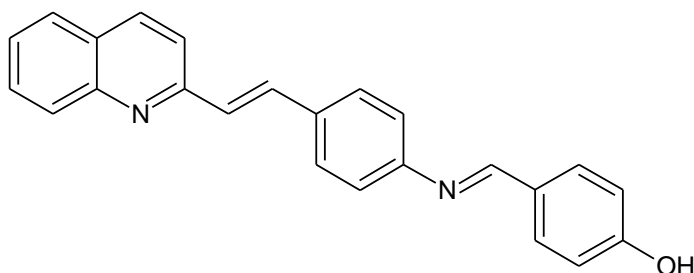
Jako produkt otrzymano żółte ciało stałe o temperaturze topnienia 172°C, z wydajnością 70%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.59 (s, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.89 – 7.85 (m, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.76 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 13.3, 5.0 Hz, 2H), 7.51 – 7.46 (m, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.85 (s, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 160.66, 156.20, 152.43, 152.37, 149.51, 148.16, 136.9, 134.22, 134.14, 130.30, 129.50, 129.10, 128.77, 128.46, 128.28, 127.46, 126.59, 124.74, 122.09, 120.45, 111.79, 109.88.

ESI-MS obliczono dla C₂₆H₂₃N₂O₂: 395.1760; [M+H]⁺ 395.1763

4-(N-{4-[(E)-2-(chinolin-2-ylo)etenylo]-fenylo}-karboksyimidoilo)-fenol (6n):



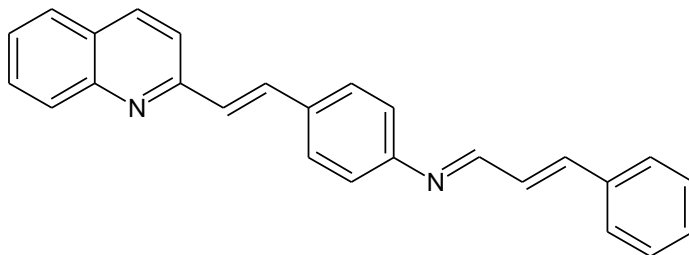
Jako produkt otrzymano żółte ciało stałe o temperaturze topnienia 248°C, z wydajnością 67%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.17 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.36 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 7.82 – 7.73 (m, 5H), 7.56 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 161.26, 160.54, 156.22, 152.62, 148.16, 136.92, 134.20, 134.02, 131.30, 130.30, 129.09, 128.74, 128.33, 128.27, 127.97, 127.45, 126.57, 122.03, 120.43, 116.17.

ESI-MS obliczono dla C₂₄H₁₉N₂O: 351.1497; [M+H]⁺ 351.1500

N-[(2E)-3-fenyloprop-2-en-1-ylideno]-4-[(E)-2-(chinolin-2-ylo)-etenylo]-anilina (6o):



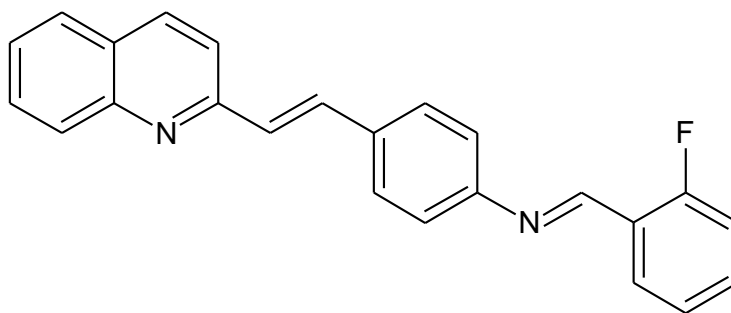
Jako produkt otrzymano żółte ciało stałe o temperaturze topnienia 195°C, z wydajnością 68%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.49 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 8.36 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.86 (dd, J = 19.9, 9.9 Hz, 2H), 7.84 – 7.66 (m, 5H), 7.51 (s, 1H), 7.49 – 7.38 (m, 5H), 7.30 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.20 (dd, J = 16.0, 8.9 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂) δ 161.47, 155.89, 152.07, 148.34, 144.13, 136.21, 135.69, 134.55, 133.53, 129.63, 129.60, 129.08, 128.90, 128.66, 128.43, 128.16, 127.53, 127.36, 126.04, 121.49, 119.60

ESI-MS obliczono dla C₂₆H₂₁N₂: 361.1705; [M+H]⁺ 361.1707.

N-[(2-fluorofenyl)metylideno]-4-[(*E*)-2-(chinolin-2-yl)-etenyl]-anilina (**6p**):



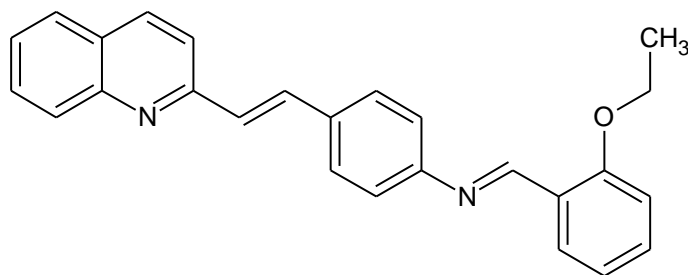
Jako produkt otrzymano żółte ciało stałe o temperaturze topnienia 124°C, z wydajnością 68%.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.85 (s, 1H), 8.37 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.14 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.92 – 7.86 (m, 2H), 7.83 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.76 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 13.2, 6.1 Hz, 1H), 7.60 – 7.47 (m, 2H), 7.43 – 7.33 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 163.65, 161.64, 156.11, 153.80, 151.80, 148.14, 136.96, 135.09, 134.22 (d, J = 8.4 Hz), 133.99, 130.32, 129.01 (d, J = 23.5 Hz), 128.80, 128.31 (d, J = 8.5 Hz), 127.49, 126.64, 125.42, 123.88 (d, J = 8.8 Hz), 122.26, 120.46, 116.69 (d, J = 20.6 Hz).

ESI-MS obliczono dla C₂₄H₁₈FN₂: 353.1448 [M+H]⁺ 353.1452.

N-[(2-etoksyphenylo)-metylideno]-4-[(*E*)-2-(chinolin-2-ylo)-etenylo]-anilina (**6r**):



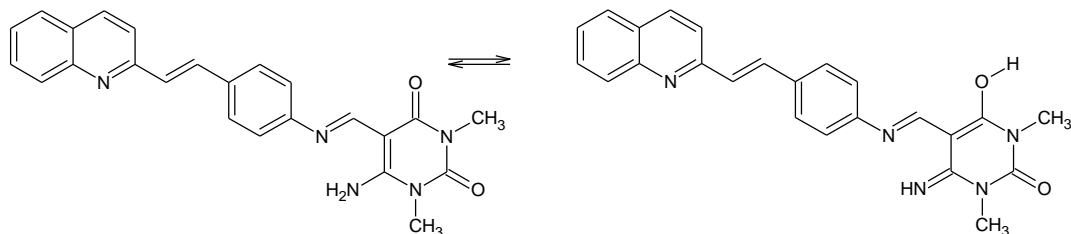
Jako produkt otrzymano żółte ciało stałe o temperaturze topnienia 167°C, z wydajnością 55%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.91 (s, 1H), 8.36 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.04 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.89 (s, J = 3.0 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.78 – 7.74 (m, 1H), 7.57 (ddd, J = 8.0, 6.9, 1.1 Hz, 1H), 7.54 – 7.51 (m, 1H), 7.49 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.17 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.07 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 4.18 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.40 (t, J = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 159.23, 156.18, 156.14, 152.85, 148.20, 136.91, 134.51, 134.12, 133.75, 130.26, 129.12, 128.80, 128.65, 128.25, 127.49, 127.43, 126.58, 124.55, 121.96, 121.12, 120.44, 113.54, 64.52, 14.76.

ESI_MS obliczono dla C₂₆H₂₃N₂O: 379.1810 [M+H]⁺ 379.1806

6-amino-1,3-dimetyl-5-[(E)-N-{4-[(E)-2-(chinolin-2-ylo)etynylo]-fenylo}-carboksy imidoilo]-1,2,3,4-tetrahydropirymidyno-2,4-dion (6s):



Jako produkt otrzymano żółte ciało stałe o temperaturze topnienia 276°C, z wydajnością 60%.

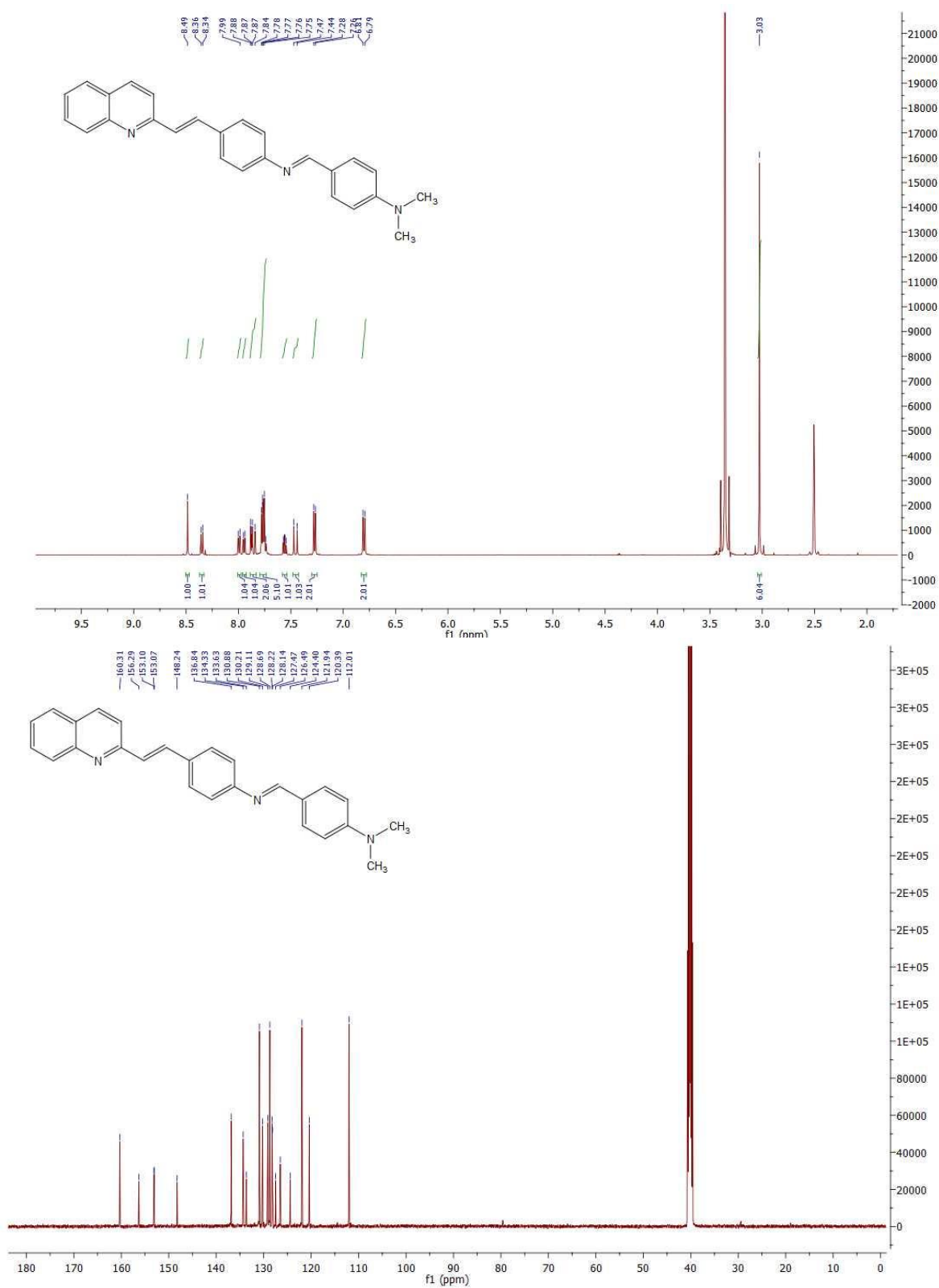
¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11.13 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.86 (t, *J* = 12.8 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H), 7.55 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.21 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 162.02, 157.29, 156.28, 155.88, 152.02, 150.78, 148.27, 136.77, 134.24, 133.47, 130.14, 129.13, 128.83, 128.17, 127.47, 126.43, 121.70, 120.35, 86.88, 29.67, 27.90.

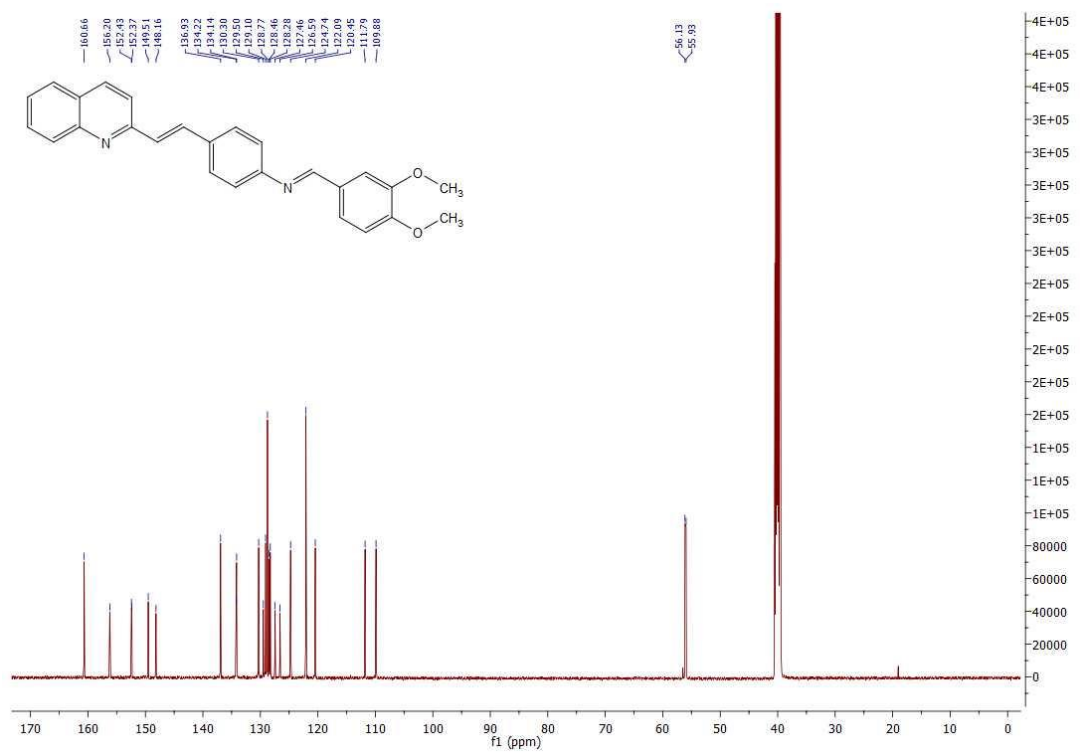
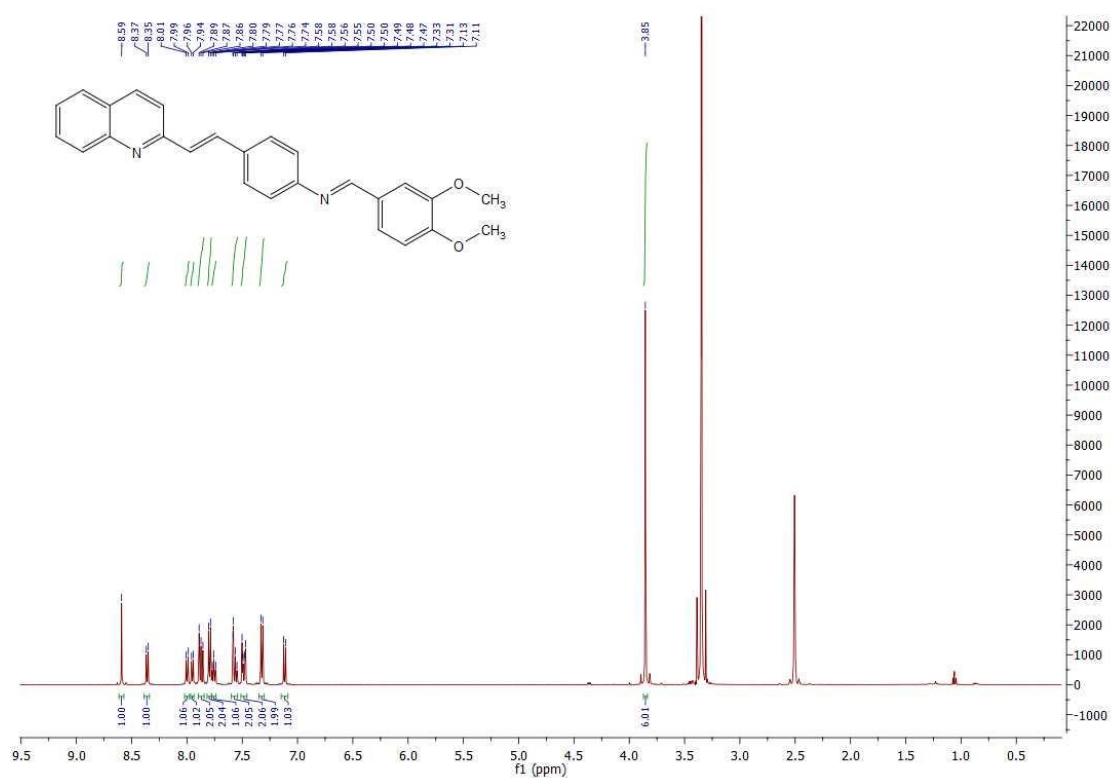
ESI-MS obliczono dla C₂₄H₂₁N₅O₂: 412.1768 [M+H]⁺ 412.1772

5.4 Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR

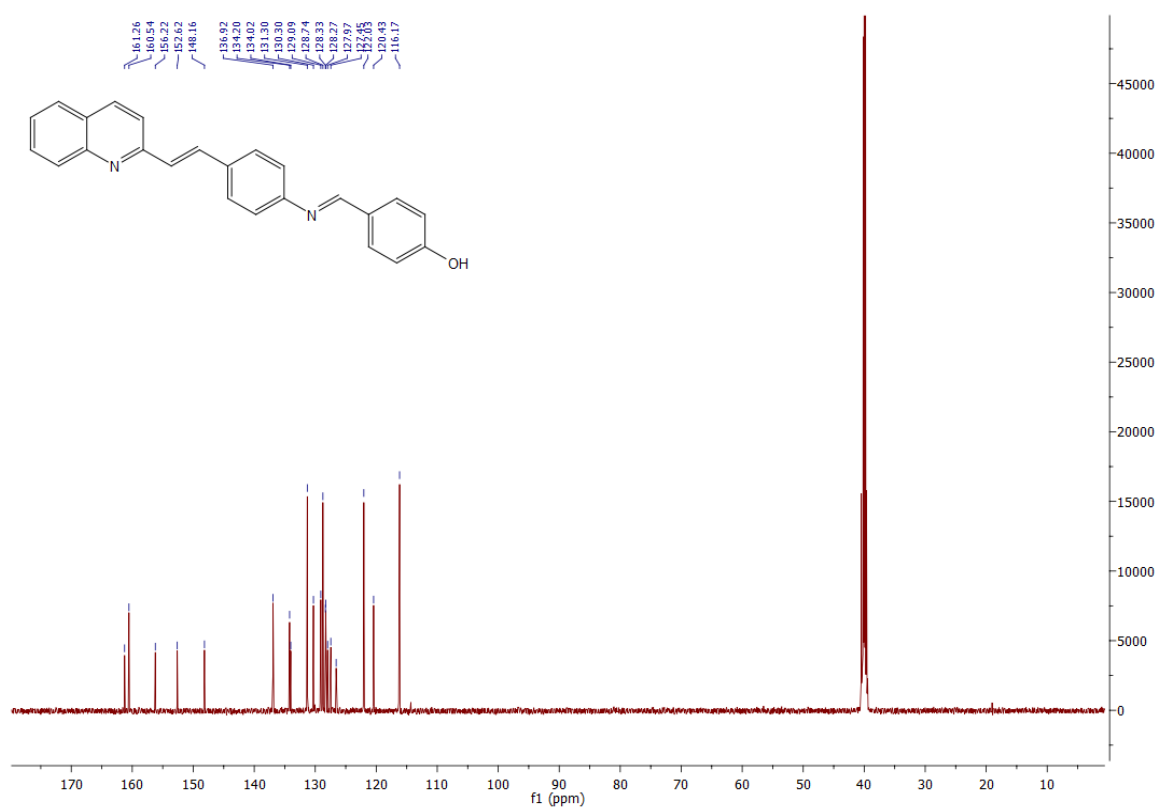
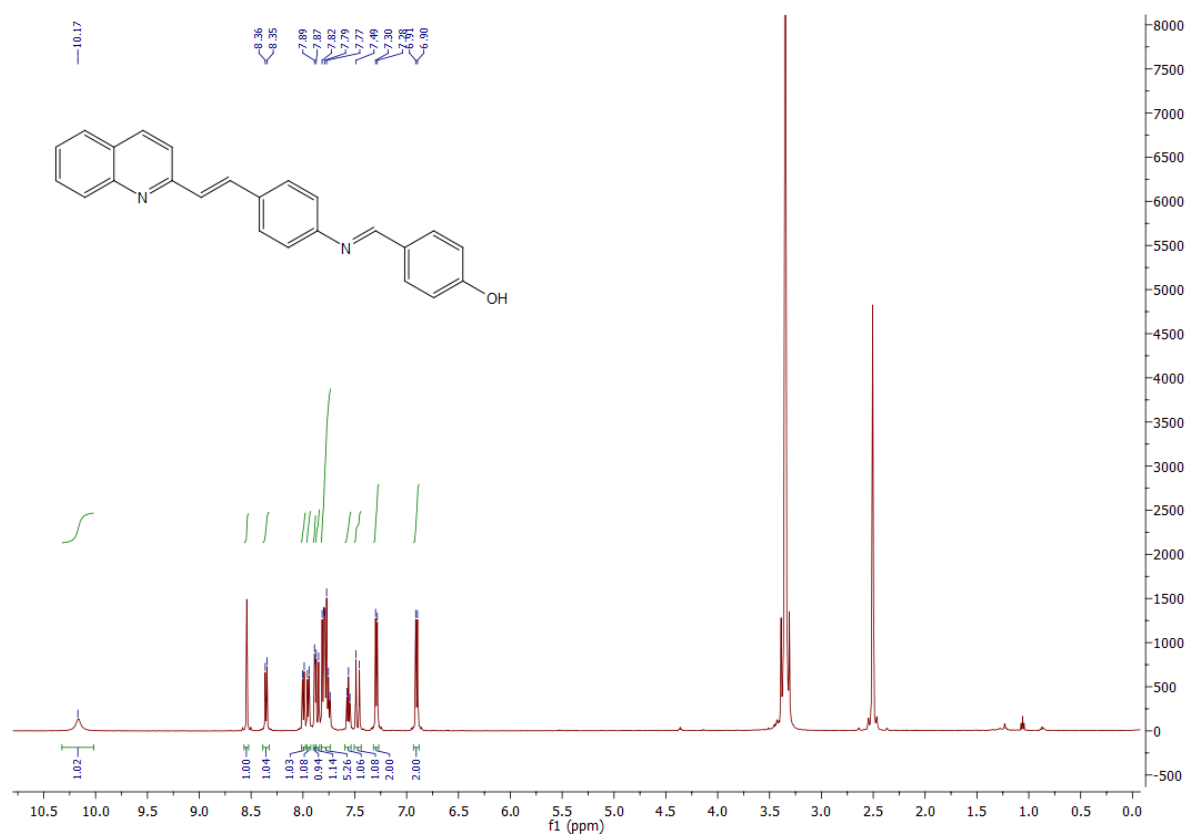
61

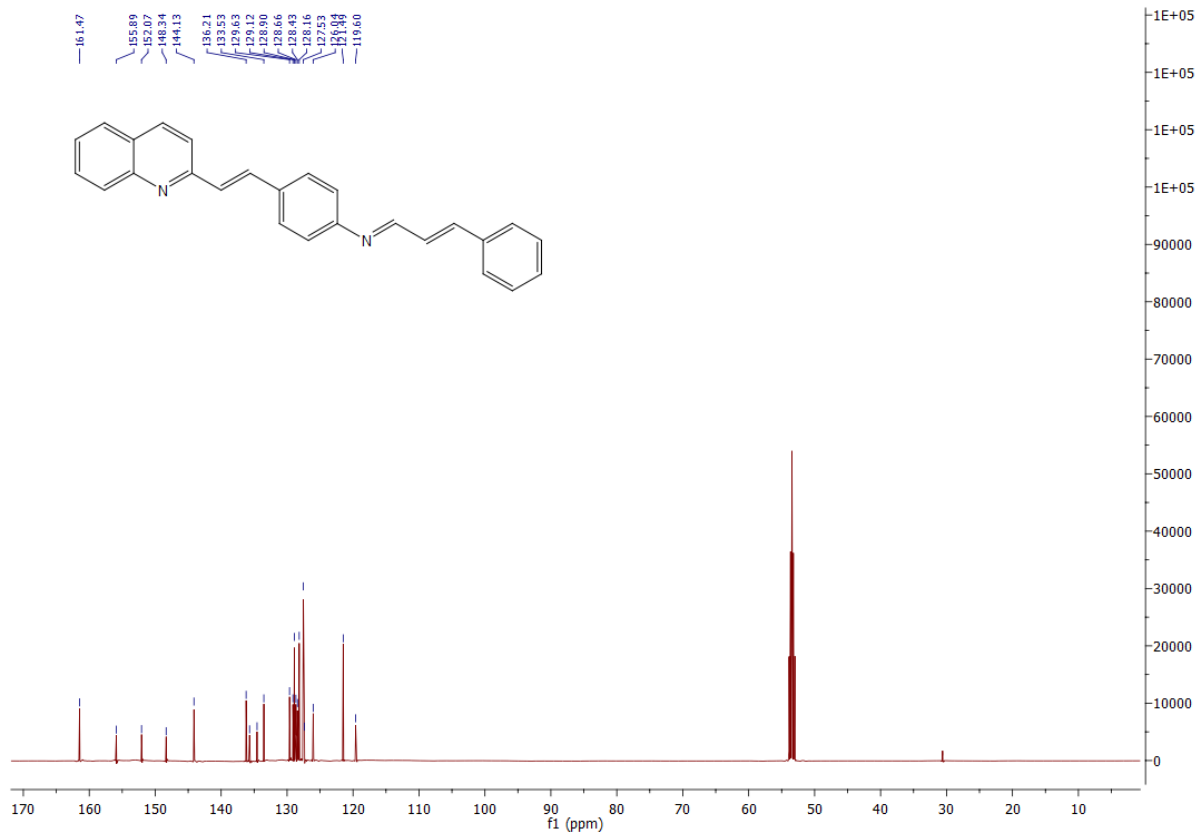
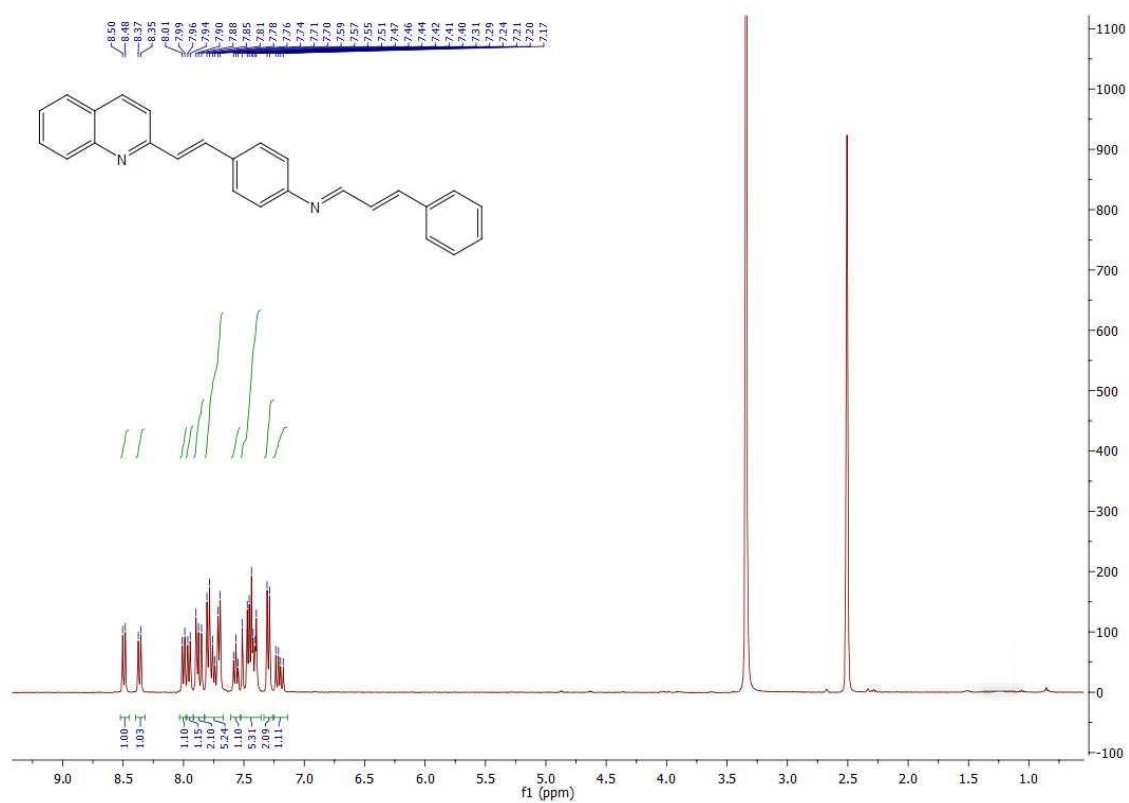


6m

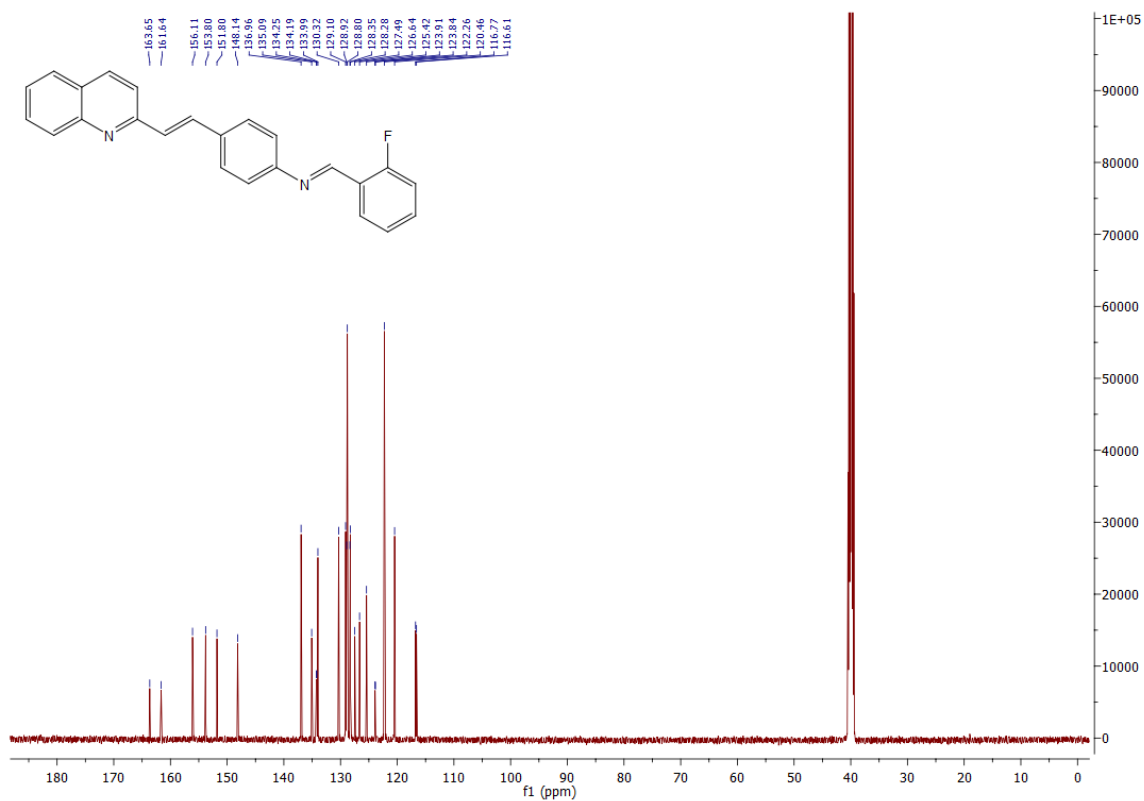
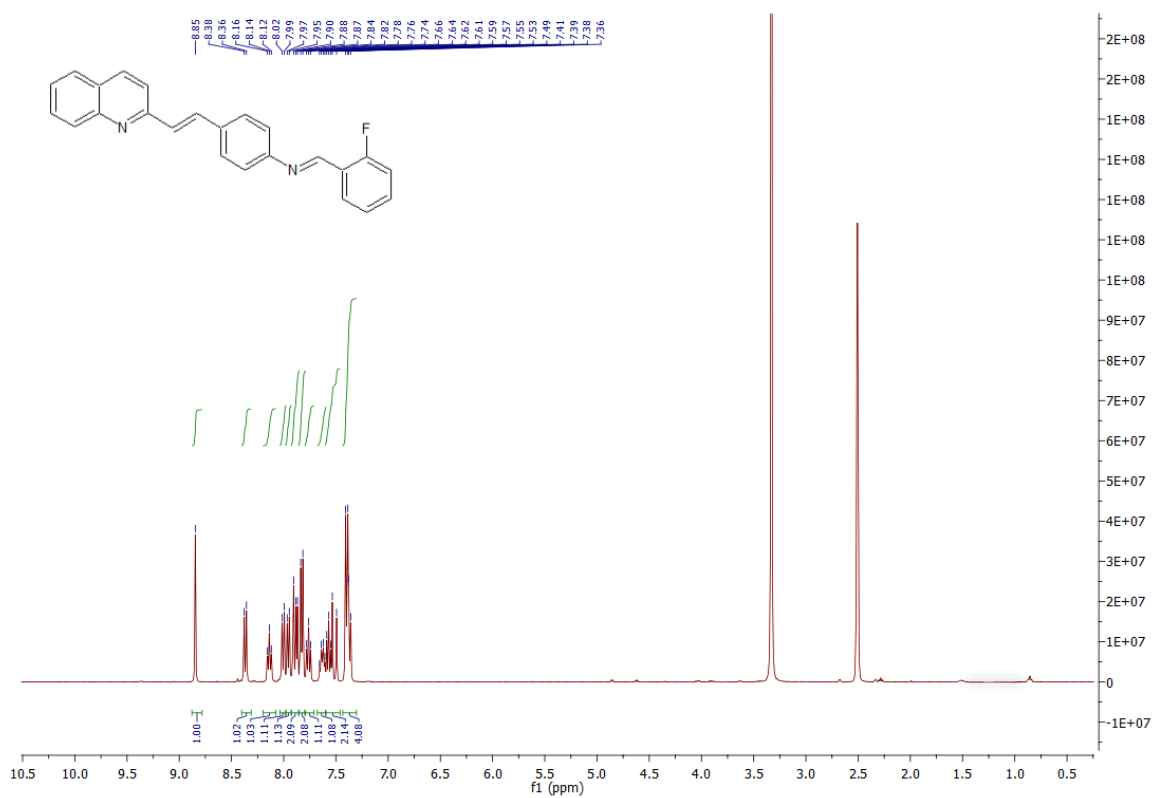


6n

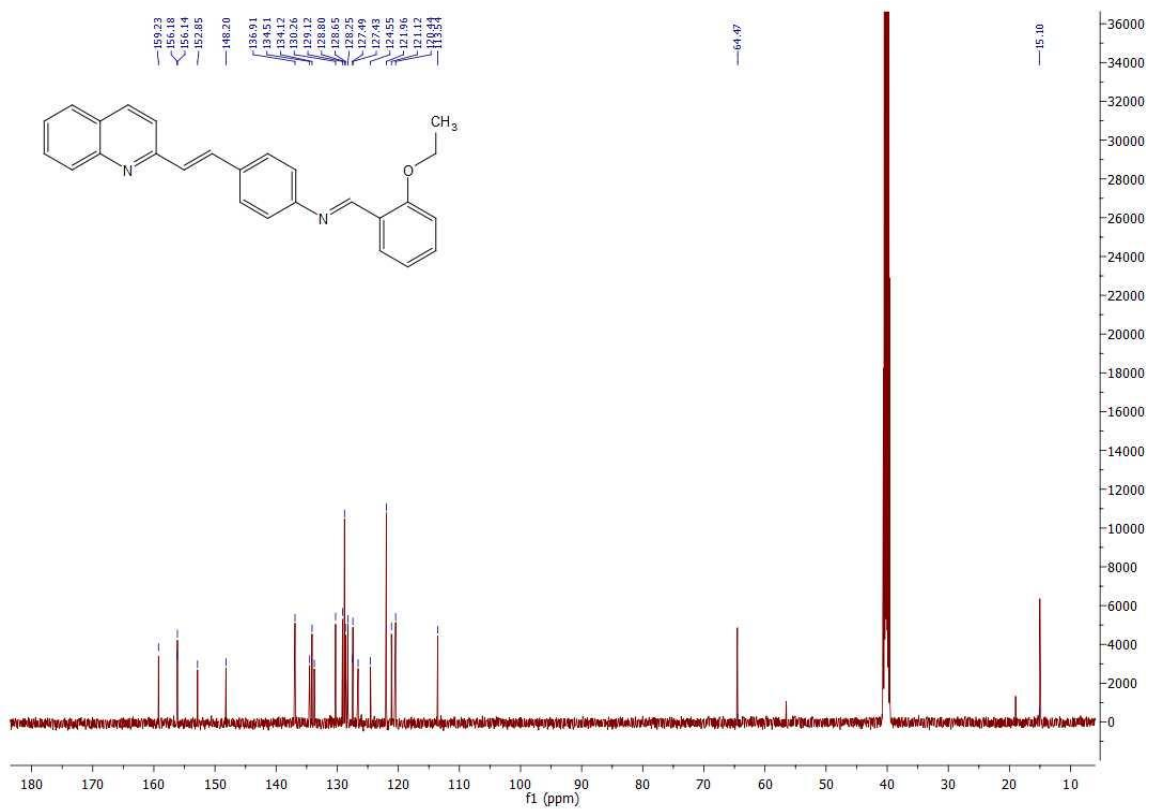
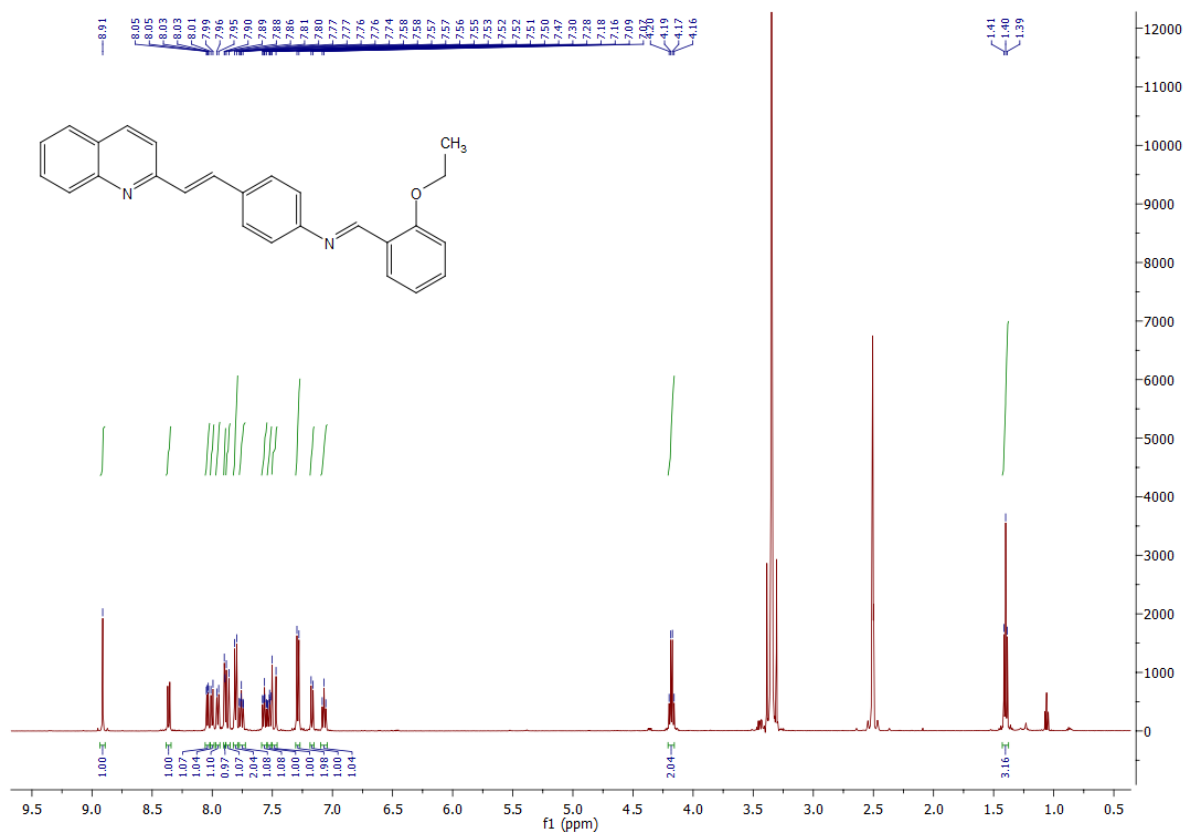




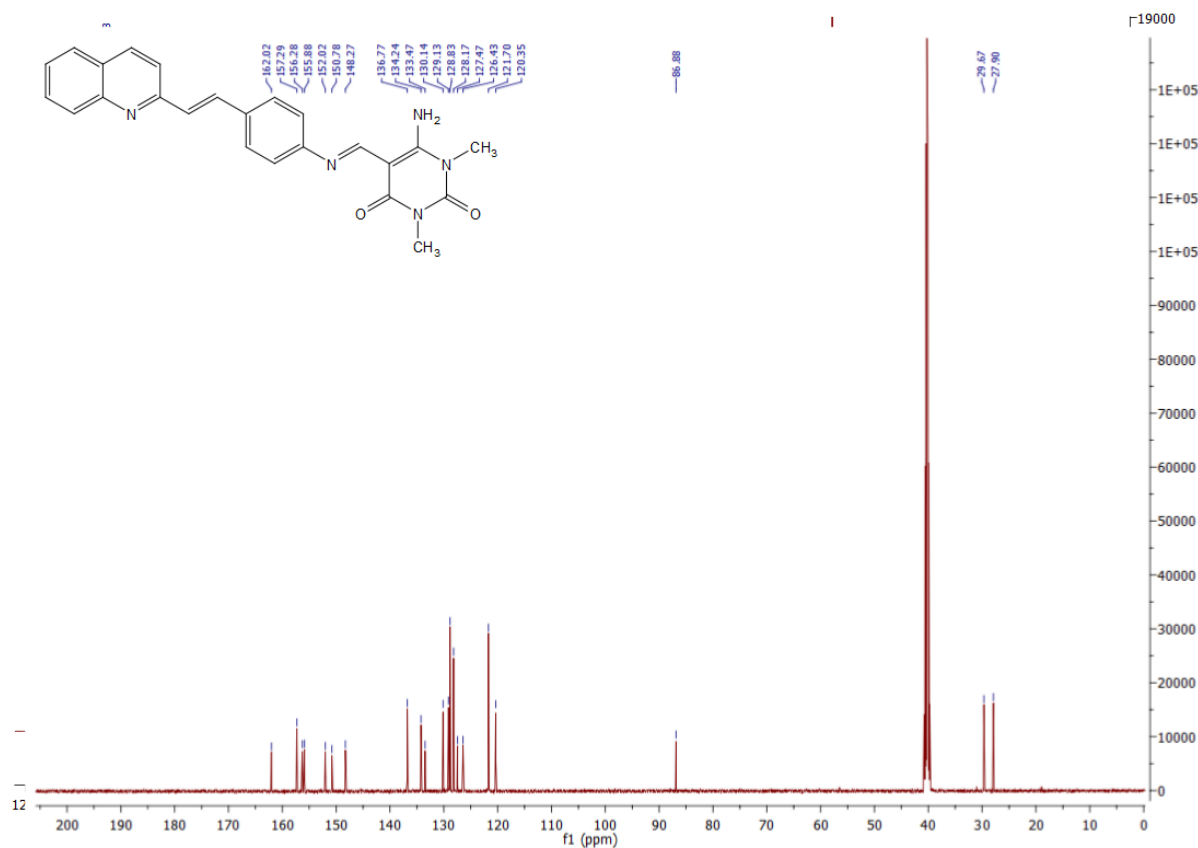
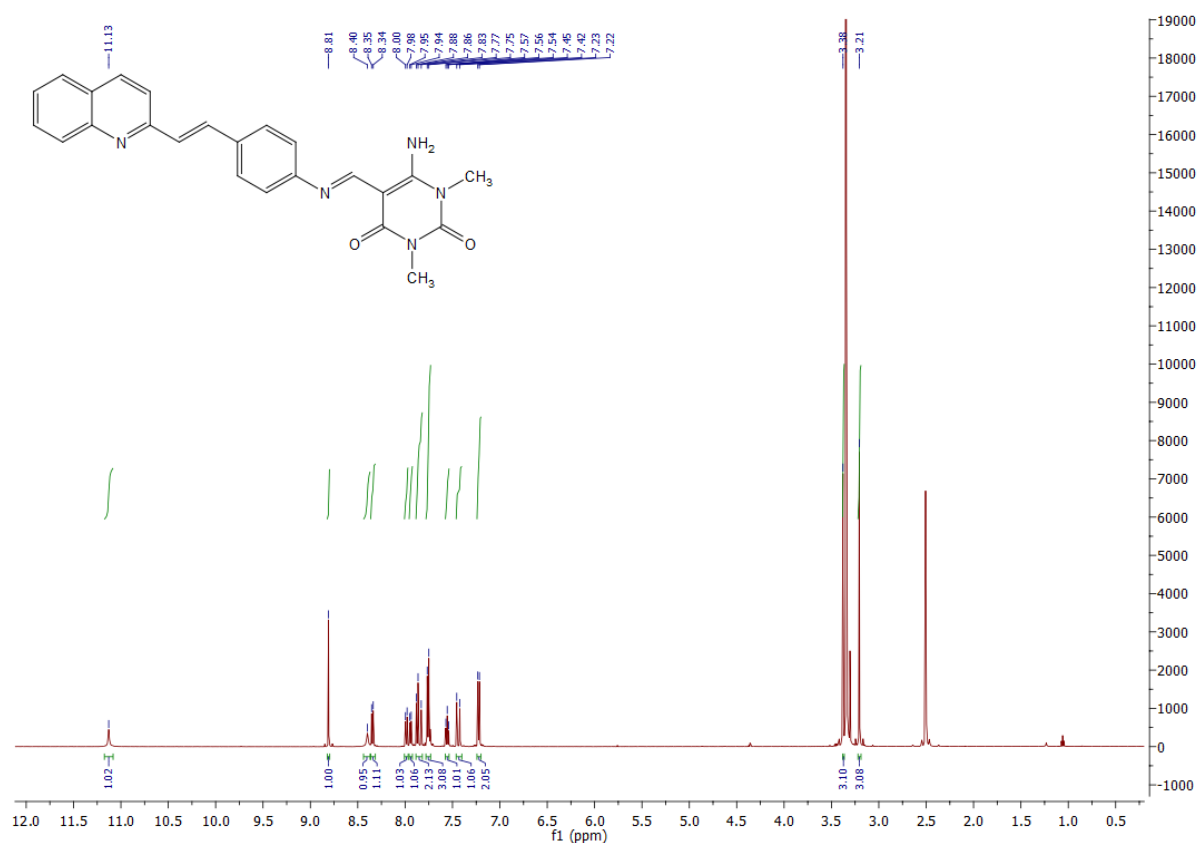
6p



6r



6s



Literatura

- [1] C. Joo, H. Balci, Y. Ishitsuka, C. Buranachai, and T. Ha, “Advances in Fluorescence Methods for Molecular Biology,” *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 51–76, 2008.
- [2] C. Chakraborty, C.-H. Hsu, Z.-H. Wen, and C.-S. Lin, “Recent advances of fluorescent technologies for drug discovery and development,” *Curr. Pharm. Des.*, 15, 1–19, 2009.
- [3] J. R. Albani, *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. Blackwell Publishing, 2007.
- [4] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, 2001.
- [5] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York: Springer, 2006.
- [6] K. Kano and J. H. Fendler, “Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles,” *Biochim. Biophys. Acta*, 509, 289–299, 1978.
- [7] D. Su, C. L. Teoh, N. Gao, Q. H. Xu, and Y. T. Chang, “A simple bodipy-based viscosity probe for imaging of cellular viscosity in live cells,” *Sensors*, 16, 1397, 2016.
- [8] H. Hou, Y. Zhao, C. Li, M. Wang, X. Xu, and Y. Jin, “Single-cell pH imaging and detection for pH profiling and label-free rapid identification of cancer-cells,” *Sci. Rep.*, 7, 1–8, 2017.
- [9] M. Whitaker, “Calcium microdomains and cell cycle control,” *Cell Calcium*, 40, 585–592, 2012.
- [10] A. Avan and T. U. Hoogenraad, “Zinc and copper in Alzheimer’s disease,” *J. Alzheimer’s Dis.*, 46, 89–92, 2015.
- [11] C. Chakraborty, C. Hsu, Z. Wen, and C. Lin, “Recent Advances of Fluorescent Technologies for Drug Discovery and Development,” *Curr. Pharm. Des.*, 15, 1–19, 2009.
- [12] M. C. Morris, “Spotlight on Fluorescent Biosensors - Tools for Diagnostics and Drug Discovery,” *ACS Med. Chem. Lett.*, 5, 99–101, 2014.
- [13] K. P. Carter, A. M. Young, and A. E. Palmer, “Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems,” *Chem. Rev.*, 114, 4564–4601, 2014.
- [14] X. Meng, S. Wang, and M. Zhu, “Quinoline-based fluorescence sensors,” in *Molecular Photochemistry—Various Aspects*, S. Satyen, Ed. InTech, 2012, 3–22.
- [15] A. Weller, “Über die Fluoreszenz der Salizylsäure und verwandter Verbindungen,” *Naturwissenschaften*, 42, 175–176, 1955.
- [16] A. Weller, “Inermolekularer Protonenübergang im angeregten Zustand,” *Electrochemistry*, 60, 1144–1147, 1956.
- [17] P. W. Jiasheng Wu, Weimin Liu, Jiechao Ge, Hongyan Zhang, “New sensing mechanisms for design of fluorescent chemosensors emerging in recent years,” *Chem.*

Soc. Rev., 40, 3483–3495, 2011.

- [18] B. Liu *et al.*, “A new ratiometric ESIPT sensor for detection of palladium species in aqueous solution w,” *Chem. Commun.*, 48, 2867–2869, 2012.
- [19] D. A. Svechkarev, G. V Karpushina, L. L. Lukatskaya, and A. O. Doroshenko, “2-(benzimidazol-2-yl)-3-hydroxychromone derivatives : spectroscopic properties and a possible alternative intramolecular proton phototransfer,” *Cent. Eur. J. Chem.*, 6, 443–449, 2008.
- [20] L. I. Haili, L. I. Hongru, Y. Long, X. U. Xiaofang, Z. Shengtao, and G. A. O. Fang, “Excited state intramolecular proton transfer fluorescence emission of o - hydroxyphenyl-triazine derivatives,” *Chinese Sci. Bull.*, 56, 1457–1460, 2011.
- [21] J. Zhao, S. Ji, Y. Chen, H. Guo, and P. Yang, “Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT): from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular probes and luminescent materials,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14, 8803–8817, 2012.
- [22] D. Y. Han *et al.*, “ESIPT-based anthraquinonylcalix[4]crown chemosensor for In³⁺,” *Tetrahedron Lett.*, 51, 1947–1951, 2010.
- [23] R. M. Wazen, S. Kuroda, C. Nishio, K. Sellin, J. B. Brunski, and A. Nanci, “A simple sensitive ESIPT on-off fluorescent sensor for selective detection of Al³⁺ in water,” *RSC Adv.*, 8, 1385–1395, 2014.
- [24] V. V Shynkar *et al.*, “Fluorescent Biomembrane Probe for Ratiometric Detection of Apoptosis,” *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 2187–2193, 2007.
- [25] A. S. Klymchenko, H. Stoeckel, K. Takeda, and Y. Me, “Fluorescent Probe Based on Intramolecular Proton Transfer for Fast Ratiometric Measurement of Cellular Transmembrane Potential,” *J. Phys. Chem. B*, 110, 13624–13632, 2006.
- [26] A. C. Sedgwick *et al.*, “Excited-state intramolecular proton-transfer (ESIPT) based fluorescence sensors and imaging agents,” *Chem. Soc. Rev.*, 47, 8842–8880, 2018.
- [27] H. Schneider, *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*, 1st ed. Cambridge: RSC Publishing, 2013.
- [28] Y. Li, T. Liu, H. Liu, M. Z. Tian, and Y. Li, “Self-assembly of intramolecular charge-transfer compounds into functional molecular systems,” *Acc. Chem. Res.*, 47, 1186–1198, 2014.
- [29] M. Suresh, P. Kar, and A. Das, “Intramolecular Charge Transfer aromatic amines and their application towards molecular logic gate,” *Inorganica Chim. Acta*, 363, 2881–2885, 2010.
- [30] L. Xu *et al.*, “Synthesis, structure, physical properties and OLED application of pyrazine–triphenylamine fused conjugated compounds,” *RSC Adv.*, 5, 63080–63086, 2015.
- [31] M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, and M. Micheloni, “New fluorescent chemosensors for metal ions in solution,” *Coord. Chem. Rev.*, 256, 170–192, 2012.
- [32] J. W. Nugent, H. Lee, H.-S. Lee, J. W. Reibenspies, and R. D. Hancock, “Mechanism of chelation enhanced fluorescence in complexes of cadmium (II), and a possible new

- type of anion sensor,” *Chem. Commun.*, 49, 9749–9751, 2013.
- [33] H. Zhu, J. Fan, J. Du, and X. Peng, “Fluorescent Probes for Sensing and Imaging within Specific Cellular Organelles,” *Acc. Chem. Res.*, 49, 2115–2126, 2016.
 - [34] H. Vakifahmetoglu-Norberg, A. T. Ouchida, and E. Norberg, “The role of mitochondria in metabolism and cell death,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 482, 426–431, 2017.
 - [35] D. Johannsen and E. Ravussin, “The role of mitochondria in health and disease,” *Curr. Opin. Pharmacol.*, 9, 780–786, 2009.
 - [36] S. Jakobs, “High resolution imaging of live mitochondria,” *Biochem. Biophys. acta*, 1763, 561–575, 2006.
 - [37] V. A. Online, “A near-infrared dye based on BODIPY for tracking morphology changes in mitochondria,” *Chem. Commun.*, 49, 10620–10622, 2013.
 - [38] C. Fennelly and R. K. Amaravadi, “Lysosomes”. 1594, 293–308, 2017.
 - [39] L. Zhang, R. Sheng, and Z. Qin, “The lysosome and neurodegenerative diseases,” *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 41, 437–445, 2009.
 - [40] P. Jiang and N. Mizushima, “Autophagy and human diseases,” *Cell Res.*, 24, 69–79, 2014.
 - [41] A. Ballabio and V. Gieselmann, “Lysosomal disorders: From storage to cellular damage,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1793, 684–696, 2009.
 - [42] P. R. Pryor, *Analyzing lysosomes in live cells*, Elsevier Inc., 2012.
 - [43] N. B. Yapici *et al.*, “Highly stable and sensitive fluorescent probes (LysoProbes) for lysosomal labeling and tracking,” *Sci. Rep.*, 5, 1–8, 2015.
 - [44] J. Fang *et al.*, “Fluorescence Imaging Lysosome Changes During Cell Division and Apoptosis with a Nile Blue Based Near-infrared Emission,” *Chem. Commun.*, 50, 882–884, 2014.
 - [45] D. Wlodkowic, J. Skommer, D. McGuinness, C. Hillier, and Z. Darzynkiewicz, “ER – Golgi network — A future target for anti-cancer therapy,” *Leuk. Res.*, 33, 1440–1447, 2009.
 - [46] T. Migita and S. Inoue, “Implications of the Golgi apparatus in prostate cancer,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 44, 1872–1876, 2012.
 - [47] H. Zhang, J. Fan, J. Wang, S. Zhang, B. Dou, and X. Peng, “An Off – On COX-2-Specific Fluorescent Probe: Targeting the Golgi Apparatus of Cancer Cells,” *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 11663–11669, 2013.
 - [48] A. S. Boutorine, D. S. Novopashina, O. A. Krasheninina, K. Nozeret, and A. G. Venyaminova, “Fluorescent Probes for Nucleic Acid Visualization in Fixed and Live Cells,” *Molecules*, 18, 15357–15397, 2013.
 - [49] I. Solovei *et al.*, “LBR and Lamin A / C Sequentially Tether Peripheral Heterochromatin and Inversely Regulate Differentiation,” *Cell*, 152, 584–598, 2011.
 - [50] R. Musiol, M. Serda, S. Hensel-Bielowka, and J. Polanski, “Quinoline-based

- antifungals.," *Curr. Med. Chem.*, 17, 1960–73, 2010.
- [51] O. Afzal *et al.*, "A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline," *Eur. J. Med. Chem.*, 97, 871–910, 2015.
- [52] R. Musiol, "Quinoline-based HIV integrase inhibitors," *Curr. Pharm. Des.*, 19, 1835–1849, 2013.
- [53] H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, and F. Vitzthum, "Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications," *Nucleic Acids Res.*, 32, e103, 2004.
- [54] M. Staderini *et al.*, "A Fluorescent Styrylquinoline with Combined Therapeutic and Diagnostic Activities against Alzheimer's and Prion Diseases.," *ACS Med. Chem. Lett.*, 4, 225–229, 2013.
- [55] R. Dhanapal, P. T. Perumal, M. Damodiran, C. Ramprasath, and N. Mathivanan, "Synthesis of quinoline derivatives for fluorescent imaging certain bacteria," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 22, 6494–6497, 2012.
- [56] D. Mahanand and J. C. Houck, "Fluorometric Determination of Zinc in Biologic Fluids," *Clin. Chem.*, 14, 6–11, 1968.
- [57] Y. Shiraishi, C. Ichimura, S. Sumiya, and T. Hirai, "Multicolor fluorescence of a styrylquinoline dye tuned by metal cations," *Chem. - A Eur. J.*, 17, 8324–8332, 2011.
- [58] B. Czaplinska *et al.*, "Comprehensive exploration of the optical and biological properties of new quinolines based cellular probes," *Dye. Pigment.*, 144, 119–132, 2017.
- [59] P. G. Wiering and J. W. Verhoeve, "Unprecedented observation of pronounced vibrational structure in charge-transfer absorption and emission spectra," *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas*, 115, 303–304, 1996.
- [60] W. Cieslik *et al.*, "Contribution to investigation of antimicrobial activity of styrylquinolines.," *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 6960–6968, 2012.
- [61] R. Musiol *et al.*, "Investigating biological activity spectrum for novel quinoline analogues 2: hydroxyquinolinecarboxamides with photosynthesis-inhibiting activity.," *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 4490–9, 2008.
- [62] R. Musiol, T. Magdziarz, and A. Kurczyk, "Quinoline scaffold as a privileged substructure in antimicrobial drugs," *Sci. against Microb. Pathog. Commun. Curr. Res. Technol. Adv.*, 72–83, 2011.
- [63] M. Rams-Baron *et al.*, "Synthesis of New Styrylquinoline Cellular Dyes, Fluorescent Properties, Cellular Localization and Cytotoxic Behavior," *PLoS One*, 10, e0131210, 2015.
- [64] A. Prakash and D. Adhikari, "Application of Schiff bases and their metal complexes-A review," *Int. J. ChemTech Res.*, 3, 1891–1896, 2011.
- [65] A. Kajal, S. Bala, S. Kamboj, N. Sharma, and V. Saini, "Schiff Bases: A Versatile Pharmacophore," *J. Catal.*, 2013, 1–14, 2013.
- [66] K. Brodowska and E. Łodyga-Chruścińska, "Schiff bases - Interesting range of applications in various fields of science," *Chemik*, 68, 129–134, 2014.

- [67] J.-C. Qin, T.-R. Li, B.-D. Wang, Z.-Y. Yang, and L. Fan, "A sensor for selective detection of Al^{3+} based on quinoline Schiff-base in aqueous media," *Synth. Met.*, 195, 141–146, 2014.
- [68] S. Halder, S. Dey, and P. Roy, "A quinoline based Schiff-base compound as pH sensor," *RSC Adv.*, 5, 54873–54881, 2015.
- [69] X. Zhou, B. Yu, Y. Guo, X. Tang, H. Zhang, and W. Liu, "Both Visual and Fluorescent Sensor for Zn^{2+} Based on Quinoline Platform," *Inorg. Chem.*, 49, 4002–4007, 2010.
- [70] R. Alam *et al.*, "A novel chromo-and fluorogenic dual sensor for Mg^{2+} and Zn^{2+} with cell imaging possibilities and DFT studies," *Analyst*, 139, 4022–4030, 2014.
- [71] D. Sarkar, A. Pramanik, S. Jana, P. Karmakar, and T. K. Mondal, "Quinoline based reversible fluorescent 'turn-on' chemosensor for the selective detection of Zn^{2+} : Application in living cell imaging and as INHIBIT logic gate," *Sensors Actuators, B Chem.*, 209, 138–146, 2015.
- [72] A. B. Pradhan *et al.*, "A highly selective fluorescent sensor for zinc ion based on quinoline platform with potential applications for cell imaging studies," *Polyhedron*, 94, 75–82, 2015.
- [73] W. Cieřlik, "Badanie spektrum aktywności biologicznej wybranych pochodnych chinoliny," rozprawa doktorska, Uniwersytet řlęska, 2015.
- [74] W. T. Mason, Ed., *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. London: Academic Press, 1999.
- [75] J. M. Menter, "Temperature dependence of collagen fluorescence," *Photochem. Photobiol. Sci.*, 5, 403–410, 2006.
- [76] A. B. T. Ghisaidoobe and S. J. Chung, "Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on förster resonance energy transfer techniques," *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 22518–22538, 2014.
- [77] I. Georgakoudi *et al.*, "NAD(P)H and Collagen as in Vivo Quantitative Fluorescent Biomarkers of Epithelial Precancerous Changes 1," *Cancer Res.*, 62, 682–687, 2002.
- [78] E. Lippert, "Dipolmoment und elektronenstruktur von angeregten molekulen," *Zeitschrift Fur Naturforsch. Part a-Astrophysik Phys. Und Phys. Chemie*, 10, 541–545, 1955.
- [79] N. Mataga, Y. Kaifu, and M. Koizumi, "The solvent effect on fluorescence spectrum - change of solute-solvent interaction during the lifetime of excited solute molecule," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 28, 690–691, 1955.
- [80] Y. Gong *et al.*, "Photophysical properties of photoactive molecules with conjugated push-pull structures," *J. Phys. Chem. A*, 111, 5806–5812, 2007.
- [81] M. Jia *et al.*, "Photophysical Properties of Intramolecular Charge Transfer in Two Newly Synthesized Tribranched Donor - π - Acceptor Chromophores," 7345–7352, 2010.
- [82] G. E. S. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel *et al.*, "Gaussian 09, Revision E.01." Gaussian Inc., Wallingford CT, 2013.
- [83] T. Yanai, D. P. Tew, and N. C. Handy, "A new hybrid exchange – correlation

- functional using the Columb-attenuating method CAM-B3LYP),” 393, 51–57, 2008.
- [84] M. Cossi, V. Barone, R. Cammi, and J. Tomasi, “Ab initio study of solvated molecules: a new implementation of the polarizable continuum model,” *Chem. Phys. Lett.*, 255, 327–335, 1996.
- [85] J. B. Foresman, T. a. Keith, K. B. Wiberg, J. Snoonian, and M. J. Frisch, “Solvent Effects. 5. Influence of Cavity Shape, Truncation of Electrostatics, and Electron Correlation on ab Initio Reaction Field Calculations,” *J. Phys. Chem.*, 100, 16098–16104, 1996
- [86] Y. Chen, J. Zhao, H. Guo, and L. Xie, “Geometry relaxation-induced large stokes shift in red-emitting borondipyrromethenes (BODIPY) and applications in fluorescent thiol probes,” *J. Org. Chem.*, 77, 2192–2206, 2012.
- [87] B. Pramanik and D. Das, “Aggregation-Induced Emission or Hydrolysis by Water? The Case of Schiff Bases in Aqueous Organic Solvents,” *J. Phys. Chem. C*, 122, 3655–3661, 2018.
- [88] J. Colston, R. W. Horobin, J. Pediani, K. K. Johal, and S. Sheffield, “Why fluorescent probes for endoplasmic reticulum are selective : an experimental and QSAR-modelling study,” *Biotech. Histochem.*, 78, 323–332, 2003.
- [89] A. Kirdant, B. K. Magar, T. K. Chondhekar, V. Mahavidyalaya, and K. D. Beed, “Kinetics and Mechanism of Hydrolysis of N-Salicylidene -p-,” *Der Chem. Sin.*, 3, 52–58, 2012.
- [90] Y. I. Yin, B. Bassit, L. Zhu, X. Yang, C. Wang, and Y.-M. Li, “ γ -Secretase Substrate Concentration Modulates the Abeta42/Abeta40 Ratio: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER DISEASE,” *J. Biol. Chem.*, 282, 32, 23639–23644, 2007.
- [91] J. Ji, N. Rosenzweig, C. Griffin, and Z. Rosenzweig, “Synthesis and application of submicrometer fluorescence sensing particles for lysosomal pH measurements in murine macrophages,” *Anal. Chem.*, 72, 3497–3503, 2000.
- [92] Y. Yue, F. Huo, S. Lee, C. Yin, and J. Yoon, “A review: The trend of progress about pH probes in cell application in recent years,” *Analyst*, 142, 30–41, 2017.
- [93] B. Gapys, A. Raszeja-specht, and H. Bielarczyk, “Rola cynku w procesach fizjologicznych i patologicznych organizmu,” *J. Lab. Diagnostics*, 50, 45–52, 2014.
- [94] X. Huang, M. P. Cuajungco, C. S. Atwood, R. D. Moir, R. E. Tanzi, and A. I. Bush, “Zinc and Health: Current Status and Future Directions The Antioxidant Properties of Zinc,” *J. Nutr.*, 130, 1488–1492, 2000.
- [95] M. P. Cuajungco and G. J. Lees, “Zinc and Alzheimer ’ s disease : is there a direct link?,” *Brain Res. Rev.*, 23, 219–236, 1997.
- [96] L. R. Perez and K. J. Franz, “Minding Metals: Tailoring Multifunctional Chelating Agents for Neurodegenerative Disease,” *Dalt. Trans.*, 39, 2177–2187, 2011.
- [97] A. Rauk, “Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer ’ s disease neurotoxic?,” *Dalt. Trans.*, 10, 1273–1282, 2008.
- [98] G. Bozhevolnov, E. A., Serebriakova, “8-p-(toluenesulfonil- amino)-quinoline is a new fluorescent reagent for zinc and cadmium,” *Khimicheskiye Reakt. i Prep.*, 24, 36–42,

- 1961.
- [99] R. E. J. Frederickson, C. J.; Kasarskis, E. J.; Ringo, D.; Frederickson, "A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain.," *Neurosci. Methods*, 20, 91–103, 1987.
 - [100] I. Sekler *et al.*, "Distribution of the Zinc Transporter ZnT-1 in Comparison With Chelatable Zinc in the Mouse Brain," *J. Comp. Neurol.*, 447, 201–209, 2002.
 - [101] R. M. Jindal, R. P. Taylor, D. W. R. Gray, R. Esmeraldo, and P. J. Morris, "A new method for quantification of islets by measurement of zinc content," *Diabetes*, 41, 1056–1062, 1992.
 - [102] P. D. Zalewski, I. J. Forbes, and W. H. Betts, "Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II)," *Biochem. J.*, 296, 403–408, 1993.
 - [103] R. Colvin, M. Laskowski, and C. P. Fontaine, "Zinquin identifies subcellular compartmentalization of zinc in cortical neurons. Relation to the trafficking of zinc and the mitochondrial compartment," *Brain Res.*, 1085, 1–10, 2006.
 - [104] H. Kim, J. Kang, K. B. Kim, E. J. Song, and C. Kim, "A highly selective quinoline-based fluorescent sensor for Zn(II)," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 118, 883–887, 2014.
 - [105] G. Xie *et al.*, "A Highly Zinc(II)-Selective Fluorescent Sensor Based on 8-Aminoquinoline and Its Application in Biological Imaging," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2011, 19, 2927–2931, 2011.
 - [106] Y. Jin, S. Wang, Y. Zhang, and B. Song, "A highly selective fluorescent chemosensor based on benzothiazole for detection of Zn^{2+} ," *Anal. Methods*, 7, 5661–5666, 2015.
 - [107] T. Dudev and C. Lim, "Tetrahedral vs Octahedral Zinc Complexes with Ligands of Biological Interest : A DFT / CDM Study," *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 14, 11146–11153, 2000.
 - [108] D. Karak *et al.*, "RSC Advances Interaction of soft donor sites with a hard metal ion : crystallographically characterized blue emitting fluorescent probe for Al (III) with cell staining," *RCS Adv.*, 2, 12447–12454, 2012.
 - [109] H. Liu *et al.*, "Sensors and Actuators B : Chemical An efficient quinoline-based fluorescence sensor for zinc (II) and its application in live-cell imaging," *Sensors Actuators B. Chem.*, 234, 616–624, 2016.

6. Dorobek naukowy

6.1 Publikacje

1. G. Pastuch-Gawolek, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Musioł, M. Serda, **B. Czaplińska**, R. Musioł, Small molecule glycoconjugates with anticancer activity, European Journal of Medicinal Chemistry, **2016**, 130–144, IF: 4.527, punkty MNiSW: 40
2. K. Łączkowski, M. Świtalska, A. Baranowska-Łączkowska, T. Plech, A. Paneth, K. Misiura, J. Wietrzyk, **B. Czaplińska**, A. Mrozek-Wilczkiewicz, K. Malarz, R. Musioł, I. Grela, Thiazole-based nitro gen mustards. Design, synthesis, spectroscopic studiem, DFT calculation, molecular docking, and antiproliferative activity against selected human cancer cell lines, Journal of Molecular Structure, 2016, 1119, 139-159, IF: 1.784, punkty MNiSW: 20
3. **B. Czaplińska**, A. M. Maroń, J. G. Małecki, G. Szafraniec-Gorol, M. Matussek, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, W. Danikiewicz, R. Musioł, A. Słodek, Comprehensive exploration of the optical and biological properties of new quinoline based cellular probes, Dyes and Pigments, **2017**, 144, 119-132, IF: 3.572, punkty MNiSW: 40
4. **B. Czaplińska**, E. Spaczyńska, R. Musioł, Quinoline fluorescent probes for zinc – from diagnostic to therapeutic molecules in treating neurodegenerative diseases, Medicinal Chemistry, **2018**, 14, 19-33, IF: 2.331, punkty MNiSW: 20
5. J. Mularski, **B. Czaplińska**, W. Cieślík, J. Bełłot, P. Bartczak, R. Sitko, J. Polański, R. Musioł, Electrolytic copper as cheap and effective catalyst for on-pot triazole synthesis, Scientific Reports, **2018**, 8, 4496, IF: 4.609, punkty MNiSW: 40
6. **B. Czaplińska**, K. Malarz, A. Mrozek –Wilczkiewicz, R. Musioł, Acid selective pro-dye for cellular compartments, Scientific Reports, *under revision*, IF: 4.609, punkty MNiSW: 40

Sumaryczny Impact Factor: 21.432

6.2 Zgłoszenia patentowe

1. J. Mularski, M. Korzec, R. Musioł, J. Polański, W. Cieślik, R. Rzycka, **B. Czaplińska**, J. Bogocz; "Sposóbotrzymywania 1,4-dwupodstawionych 1,2,3-Triazoli w reakcji cykloaddycji lub w syntezie one pot z udziałemkatalizatorów", P.412140, **2015** (10%)
2. **B. Czaplińska**, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł; Nowa pochodna paraaminostyrylochinoliny oraz jej zastosowanie, P.419320, **2016** (25%)
3. **B. Czaplińska**, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł; Nowe zastosowanie pochodnych para-iminostyrylochinoliny, P.419317, **2016** (25%)
4. **B. Czaplińska**, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł; Nowa pochodna styrylochinoliny oraz jej zastosowanie, P.420283, **2017**, (25%)

6.3 Patenty

1. **B. Czaplińska**, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł; Nowe zastosowanie pochodnych para-iminostyrylochinoliny (numer w toku nadania), 2019

6.4 Konferencje krajowe

1. B. Czaplińska, R.Musioł, "Synthesis of quinazoline derivatives as potential tyrosine kinases inhibitors in targeted therapy", Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, 21-22.11.2014, poster
2. B. Czaplińska, R.Musioł, „Synthesis of new fluorophores based on quinoline scaffold” XIII Ogólnopolskie Seminarium Doktorantów "Na pograniczu chemii i biologii", Karpacz, 31.05.-03.06.2015, komunikat
3. B. Czaplińska, K.Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł, “Synthesis and characterization of novel Shiff bases with quinoline scaffold"V Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Kraków, 03-05.07.2015, poster
4. B. Czaplińska, K.Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł „Characterization of new green fluorohpores", VII Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, 17-19.09.2015, poster

5. B. Czaplińska, K.Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł, „Synteza i charakterystyka nowych fluoroforów opartych na szkielecie chinoliny IV konferencja pt. „Pomiędzy naukami – zjazd fizyków I chemików.”, Chorzów, 18.09.2015, poster
6. B. Czaplińska, K.Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł, „Synthesis and characterization of new fluorophores based on quinoline scaffold 58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Gdańsku, Gdańsk, 21-25.09.2015, poster

6.5 Konferencje międzynarodowe

1. B. Czaplińska, K.Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł, “Characterization of new green fluorophores based on quinoline scaffold" 44th Conference Drug Synthesis and Analysis, Brno, Czechy, 02-04.09.2015, poster
2. B. Czaplińska, K.Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł, „New Schiff bases as green fluorophores for potential biological application” 4th ESP Photobiology School, Brixen/Bressanone, Włochy 20-25.06.2016, poster
3. B. Czaplińska, R. Musioł; „Theoretical investigations of fluorophores with Schiff base moiety”, Introduction to Gaussian: Theory and Practice, Santiago de Compostela, Hiszpania, 10-14.07.2017r, poster

6.6 Staże naukowe i szkolenia

1. Staż naukowy programu ERASMUS, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Włochy, 06.2014 – 09.2014; synteza pochodnych chinoliny jako czynników przeciwko wirusowi HIV, inhibitorów kinazy CK2, synteza czynników przeciwgrypowych
2. Staż naukowy programu ERASMUS, Madeira Chemistry Research Centre (CQM), University of Madeira 07-10.2016; tytuł projektu: Synthesis and characterization of a new family of Poly(alkylidenamines) dendrimers functionalized with quinoline scaffolds for theranostic
3. Szkolenie z zakresu fotobiologii, certyfikat European Society for Photobiology, ESP Photobiology School, Brixen/Bressanone, Włochy 20-25.06.2016
4. Szkolenie z zakresu obliczeń teoretycznych DFT, Introduction to Gaussian: Theory and Practice, Santiago de Compostela, Hiszpania, 10-14.07.2017

